



Untersuchung der Rolle der potentiellen Grünlichtrezeptoren OpsA
und OpsB in dem filamentösen Pilz *Alternaria alternata*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. Nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Christoph Pinecker

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

2. Referent: Prof. Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2016 bis Dezember 2019 am Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter der Betreuung von Prof. Dr. Reinhard Fischer durchgeführt.

Karlsruhe, den

Christoph Pinecker

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 <i>Alternaria alternata</i>	3
2.2 Lichtwahrnehmung in Pilzen	5
2.2.1 Rhodopsine	5
2.2.2 Der <i>White collar</i> Komplex	10
2.2.3 Phytochrom	12
2.3 Der cAMP-PKA Signalweg	13
2.4 Der HOG Signalweg	17
2.5 CRISPR/Cas9	18
2.6 Ziel dieser Arbeit	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems	23
3.2 Inaktivierung von OpsA und OpsB in <i>A. alternata</i>	31
3.3 Die Inaktivierung von <i>opsA</i> und <i>opsB</i> war erfolgreich und sie regulieren sich gegenseitig	34
3.4 Morphologische Charakterisierung der Opsin-defekten Stämme	37
3.4.1 Die Inaktivierung der Opsine wirkt sich negativ auf die Sporenproduktion aus	39
3.5 Grünlicht führt zu einer OpsB-abhängigen Phosphorylierung von HogA	40
3.6 Lokalisierung von OpsA und OpsB in <i>A. alternata</i>	42
3.2.1 OpsA und OpsB lokalisieren an unterschiedlichen Membranen	43
3.7 Untersuchung des Einflusses von pH auf <i>A. alternata</i>	45
3.7.1 OpsA spielt eine Rolle beim Wachstum auf saurem und basischem Medium	46
3.7.2 <i>A. alternata</i> verändert den pH in seiner Umgebung	48
3.7.3 Bestrahlung mit Licht beeinflusst den Ansäuerungs-Alkalisierungsprozess in WT und sCP2	48
3.8 Untersuchung der Keimungsrate von <i>A. alternata</i>	56
3.8.1 Die Inaktivierung von <i>opsB</i> führt zu einer reduzierten Keimungsrate	56
3.8.2 Der pH-Wert beeinflusst die Keimungsrate	58
3.8.3 Die Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A fördert die Keimung	61

3.9 Die Inaktivierung beider Opsine in einem Stamm führt zu einer erhöhten Virulenz	64
3.10 OpsA und OpsB führen in <i>A. nidulans</i> zur Produktion von Kleistothezien	65
4. Diskussion	67
4.1 Die Verteilung und Rolle von Opsinen ist nicht konserviert	67
4.2 OpsA lokalisiert an der Vakuolenmembran	68
4.3 Das zytoplasmamembranständige OpsB beeinflusst die Keimung der Sporen	70
4.4 Phosphorylierung von HogA durch Grünlicht	71
4.5 Beide Opsine beeinflussen die Sporulation	73
4.6 <i>A. alternata</i> verändert den pH seiner Umgebung. Aushängeschild seiner Virulenz?	74
4.7 Modell zur Signalweiterleitung von OpsA und OpsB	77
5. Material und Methoden	79
5.1 Chemikalien	79
5.2 Verwendete Stämme von <i>A. alternata</i> , <i>A. nidulans</i> und <i>E. coli</i>	79
5.3 Kultivierung der Organismen	80
5.4 Molekularbiologische Methoden	80
5.4.1 Plasmide	82
5.4.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	83
5.4.3 Restriktionsverdau	84
5.4.4 Gelelektrophorese	84
5.4.5 Isolation genomischer DNA aus <i>A. alternata</i>	85
5.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	86
5.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten	88
5.4.8 Transformation von <i>E. coli</i>	89
5.4.9 Transformation von <i>A. alternata</i>	90
5.4.10 Transformation von <i>A. nidulans</i>	91
5.4.11 Isolation von RNA	92
5.4.12 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	92
5.4.13 Immunfluoreszenz	93
6. Literaturverzeichnis	94

1. Zusammenfassung

Alternaria alternata ist ein filamentöser Pilz, der weltweit vorkommt und verschiedenste Lebensräume besiedelt. So ist er unter anderem im Boden vorzufinden, wo er als Saprophyt organisches Material zersetzt, aber auch als Parasit auf Pflanzen. Durch sein breites Wirtsspektrum ist er in der Lage eine Vielzahl von Pflanzen zu befallen. Dabei verursacht er, nicht nur durch die Schwächung von Kulturpflanzen erheblichen wirtschaftlichen Schäden, sondern auch durch die Kontamination mit Mykotoxinen. Die prominentesten sind Alternariol, Alternariolmonoethylether, Tenuazonsäure und die Alternotoxine I – III wodurch er eine erhebliche Gefahr für die Gesundheit darstellt. Darüber hinaus ist *A. alternata* in der Lage über 70 Sekundärmetabolite zu produzieren. Für die Synthese von Sekundärmetaboliten sind in der Regel Polyketidsynthasen verantwortlich. *A. alternata* besitzt zehn Polyketidsynthasecluster, was im Vergleich mit anderen filamentösen Pilzen wenig ist. Diese Eigenschaft gepaart mit der Tatsache, dass er so ein breites Wirtsspektrum aufweist, lassen vermuten, dass dieser Pilz ein sehr gut entwickeltes Regulationsnetzwerk auf molekularer Ebene besitzt.

Ein wichtiger Faktor der von Regulationsnetzwerken verarbeitet wird ist Licht. Licht ist neben Nährstoffen einer der wichtigsten Umweltfaktoren, der die Entwicklungsprozesse und metabolischen Prozesse von fast allen Organismen der Erde beeinflusst. Filamentöse Pilze besitzen verschiedene Photorezeptoren mit denen sie Licht wahrnehmen können. *A. alternata* besitzt den Rotlichtrezeptor Phytochrom (FphA) und Orhtologe Blaulichtrezeptoren WC-1, WC-2 und Cryptochrom (CryA). Die Blau- und Rotlichtwahrnehmung ist in Pilzen bereits relativ gut erforscht. Darüber hinaus kodiert das Genom von *A. alternata* für zwei putative Grünlichtrezeptoren Opsine, deren Funktion in Pilzen hingegen bis heute nicht eindeutig geklärt ist. Untersuchungen von Opsin-Deletionsmutanten in verschiedenen Pilzen identifizierten abweichende Phänotypen, die häufig unter normalen Laborbedingungen nicht erkennbar waren, was es schwierig macht, ihnen eine Funktion zuzuweisen.

Da *A. alternata* im Vergleich zu etablierten Modelorganismen genetisch schwer zugänglich ist, konnten erst mit der Etablierung eines CRISPR/Cas9-Systems zuverlässig *knockout*-Mutanten erzeugt werden. In dieser Arbeit wurden die beiden Opsine OpsA und OpsB dieses Pilzes in seinen Zellen lokalisiert, mittels CRISPR/Cas9 deletiert und die Deletionsmutanten untersucht. OpsB lokalisiert ausschließlich an der Zytoplasmamembran, wohingegen OpsA hauptsächlich an den Vakuolen vorzufinden ist.

Die Deletion von *opsA* führt zu einer reduzierten Sporenproduktion, einem stark eingeschränkten Koloniewachstum und einer veränderten Beeinflussung des pH-Wertes seiner Umgebung. Letzteres konnte in geringerem Maß für eine *wc-1*-Deletionsmutante beobachtet werden, was einen Hinweis auf ein Zusammenspiel dieser beiden Proteine gibt. Die Deletion von *opsB* führte zu einem leicht verstärkten Koloniewachstum, einer reduzierten Sporenbildung, einer reduzierten Keimungsrate und einem geringeren cAMP-Gehalt. Die Rekplementation des *opsB*-Deletionsstamms mit einer C-terminal *getaggt*en Version von OpsB konnte die verringerte Keimungsrate nicht retten und zeigt somit die Regulation der Keimung durch den C-Terminus von OpsB. Zudem konnte durch Deletion von *opsB* der Verlust der grünlichtabhängigen Phosphorylierung von HogA nachgewiesen werden. Durch Expressionsanalysen der Deletionsstämme konnte die gegenseitige negative Regulation von *opsA* und *opsB* beobachtet werden, was einen Hinweis darauf gibt, dass sich ihre biologischen Funktionen teilweise überschneiden. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass nur die Deletion beider Opsin-Gene zu einer erhöhten Virulenz führt und zeigt zudem, dass beide Opsine zusammen die Virulenz negativ beeinflussen.

2. Einleitung

2.1 *Alternaria alternata*

Alternaria alternata ist ein weltweit verbreiteter, filamentöser Pilz, der zu den Ascomyceten gezählt wird. Der Pilz zeigt in seiner Entwicklung keinen offensichtlichen sexuellen Zyklus. Durch seine Eigenschaft das Pigment Melanin in die Wände seiner Sporen einzulagern erscheint er dunkelbraun bis schwarz (**Abb. 1**). Die Sporen sind birnenförmig und zumeist mehrfach quer und häufig ein bis mehrere male längs septiert (**Abb. 1**).

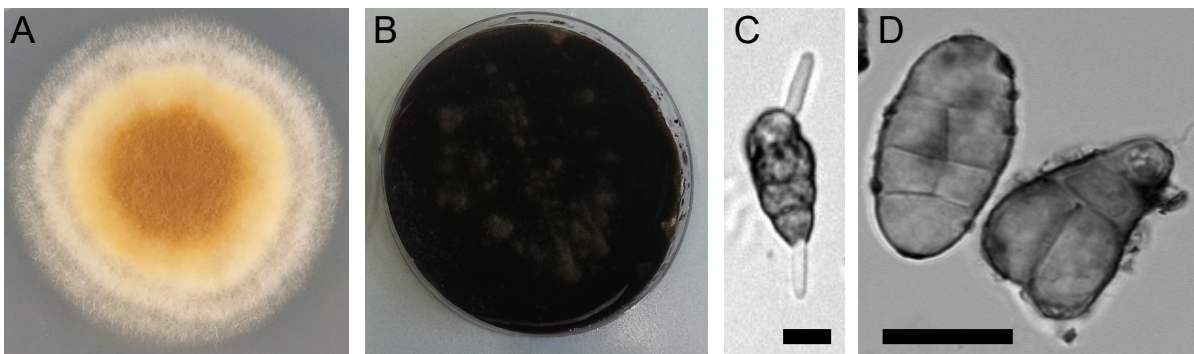


Abbildung 1: Erscheinungsbild und Sporenmorphologie von *A. alternata*. **A:** Drei Tage alte Kolonie von *A. alternata* auf mCDB-Agar. Die Kolonie hat gerade erst begonnen Sporen zu bilden und Melanin einzulagern und erscheint deshalb braun (Koloniedurchmesser: 2,3 cm). **B:** 12 Tage alte, gut bewachsene mCDB-Agarplatte (Durchmesser: 9,2 cm). Die ältere Kultur hat deutlich mehr Sporen und Melanin gebildet und erscheint deshalb schwarz. **C, D:** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Konidiosporen. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μ m. **C:** Die Spore ist mehrfach querseptiert und keimt an zwei Stellen aus. **D:** Bei diesen Sporen sind deutlich Längsseptierungen erkennbar.

A. alternata ist in der Lage eine Vielzahl unterschiedlicher Habitate zu besiedeln. So ist er unter anderem im Boden vorzufinden, wo er als Saprophyt organisches Material zersetzt und so Teil des Ökosystems ist. Er kann aber auch in das Habitat von Menschen vordringen und Tapeten, Putz oder Textilien besiedeln. Durch die Besiedelung unserer Wohnräume kann er Allergien hervorrufen (Edmonson *et al.*, 2005) und steht im Verdacht Asthma auszulösen (Bush & Prochnau, 2004; Salo *et al.*, 2006). In seltenen Fällen können auch Augen und Nagelbetten betroffen sein (Pastor & Guarro, 2008). Darüber hinaus ist *A. alternata* ein Pflanzenpathogen und der Auslöser der Sprühfleckenkrankheit von Kartoffeln, Äpfeln, Zitrusfrüchten, Bohnen und Tomaten (**Abb. 2**). *A. alternata* ist potentiell in der Lage über 100 verschiedene Pflanzen zu befallen (Lee *et al.*, 2015), wird jedoch als Schwächeparasit gewertet und befällt somit hauptsächlich geschwächte oder verwundete Pflanzen. Dennoch ist *A. alternata* von wirtschaftlicher Relevanz, da er neben dem Befall

und der parasitären Lebensweise an verschiedenen Kulturpflanzen auch Ernten nach der Einfuhr mit produzierten Mykotoxinen verdirbt. So verursacht dieser Pilz jährlich große Schäden in der Landwirtschaft und der Lebensmittelindustrie (Coates & Johnson, 1997). Desweiteren ist *A. alternata* von Interesse für den Menschen, da er eine Vielfalt an Sekundärmetaboliten produzieren kann. Dabei kann es sich zum einen um Stoffe handeln, die in der Pharmazie Anwendung finden und zum anderen um oben genannte Mykotoxine, die für den Menschen potentiell gesundheitsgefährdend sind. Die bekanntesten Mykotoxine, die er synthetisieren kann sind Alternariol (Bräse *et al.*, 2009; Wenderoth *et al.*, 2019), Alternariol-Monoethylether, Altenuen, Tenuazonsäure und die Alvertoxine I – III. Studien von Liu *et al.* und Zhen *et al.* verbinden Alternariol und Alternariol-Monoethylether mit der Entstehung von Speiseröhrenkrebs (Liu *et al.*, 1991; Zhen *et al.*, 1991).

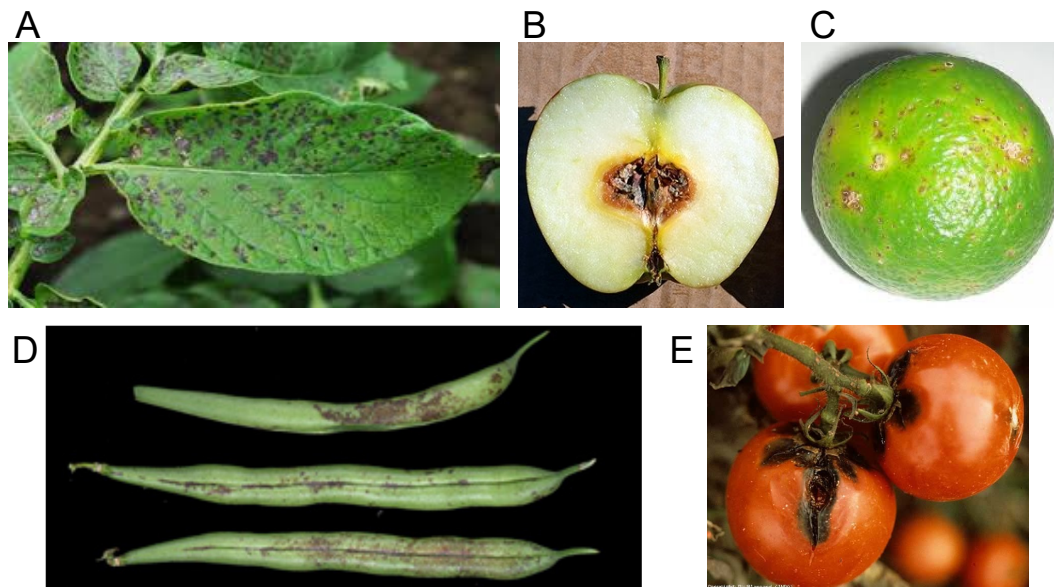


Abbildung 2: *A. Alternata* Befall auf verschiedenen Kulturpflanzen. Als Pflanzenpathogen für verschiedene Kulturpflanzen ist *A. alternata* Verursacher erheblicher Verluste in der Landwirtschaft. Er ist zum Beispiel Verursacher der Sprühfleckenkrankheit auf Kartoffelpflanzen (A, <https://www.baselland.ch>), Zitrusfrüchten (C, <http://www.agrilifecdn.tamu.edu>) und Bohnen (D, <http://www.plantmanagementnetwork.org>). E: *A. alternata* Befall auf Früchten der Tomatenpflanze (<http://www.ephytia.inra.fr>). Da Tomaten relativ weich und wässrig sind, ist das Pilzwachstum in diesem Fall sehr deutlich zu sehen. B: Bei Äpfeln ist häufig das Kerngehäuse befallen (<https://www.forestryimages.org>). So kann sich *A. alternata*, vom Landwirt unbemerkt, ausbreiten und im schlimmsten Fall große Mengen eingelagerter Äpfel verderben.

2.2 Lichtwahrnehmung in Pilzen

Licht ist eine wichtige Quelle für Energie und Informationen für viele Lebewesen auf diesem Planeten. Obwohl Pilze weder Photosynthese betreiben, noch in der Lage sind Objekte in ihrer Umgebung wie Mensch oder Tier zu sehen, zeigt der überwiegende Teil der Pilze irgendeine Art von Reaktion auf Licht (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010; Dasgupta *et al.*, 2016; Fuller *et al.*, 2016; Corrochano, 2019; Yu & Fischer, 2019; . Diese Reaktionen reichen von Anpassungen in der Entwicklung, wie zum Beispiel die Keimung von Sporen oder die Regulation der asexuellen/sexuellen Entwicklung, über Veränderungen im Metabolismus, wie die Produktion bestimmter Sekundärmetabolite, bis hin zu Pathogenität (Idnurm & Crosson, 2009; Fuller *et al.*, 2015). Auch wenn nicht unbedingt allgemeingültige Aussagen über die Reaktion auf Licht bei verschiedenen Pilzarten gemacht werden können, so ist die Änderung in der Sporenproduktion eine verbreitete Reaktion auf Licht. Licht ist der Schlüssel zur Verbreitung von Pilzen in der Natur und die Erforschung der Lichtwahrnehmung birgt das Potential die Verbreitung zu kontrollieren.

Pilze kodieren in ihren Genomen Vertreter der wichtigsten Klassen der Photorezeptoren, die aus anderen Organismen bekannt sind, nämlich Opsine, Phytochrome, Cryptochrome und Proteine mit LOV- (light, oxygen, voltage) Domänen (Avalos & Estrada, 2010; Chen *et al.*, 2010; Schumacher, 2017). Während bei manchen Proteinen, wie zum Beispiel DNA reparierende Photolyasen, eine simple biochemische Reaktion durch das Licht induziert wird, aktivieren andere eine komplizierte Signalkaskade, die zu Änderungen in der Genexpression führen. Manche Arten kodieren für alle Typen von Photorezeptoren in ihrem Genom, wohingegen die meisten Photorezeptoren sporadisch im Reich der Pilze verteilt sind (Idnurm *et al.*, 2010). Der filamentöse Pilz *A. alternata* besitzt Vertreter aller Typen (Pruß *et al.*, 2014).

2.2.1 Rhodopsine

Rhodopsine sind eine Gruppe Grünlichtrezeptoren die aus einem Protein (Opsin) und einem Retinal-Chromophor bestehen (Spudich, 1998; Spudich *et al.*, 2000; Spudich & Luecke, 2002; Sudo *et al.*, 2005). Sie sind in allen Domänen des Lebens vertreten, allerdings wird vermutet, dass viele der potentiell Opsin-kodierenden Sequenzen, die bei der Genomsequenzierung von höheren Pflanzen gefunden wurden, auf Kontaminationen von Pilzen im Pflanzenmaterial zurückzuführen sind (Brown, 2004). Gemeinsam ist allen, dass sie sieben Transmembranhelices haben, die in der Membran eine fassähnliche

Struktur bilden (**Abb. 3**) und das Retinal-Chromophor durch eine Schiff-Base kovalent an ein konserviertes Lysin inmitten der siebten Transmembranhelix (auch G-Helix) gebunden ist. Funktionell sind Rhodopsine Retinal-Photoisomerasen. Wird Licht absorbiert isomerisiert das Retinal und die Schiff-Base wird deprotoniert. Daraufhin vollzieht das Opsin-Protein eine Konformationsänderung, gefolgt von der Transduktion des Lichtsignals. Rhodopsine werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: Visuelle Rhodopsine vom Typ II (Spudich *et al.*, 2000) sind G-Protein gekoppelte Photorezeptoren, die als sichtbare Pigmente mit pinker Farbe in Tieren vorkommen und 11-*cis*-Retinal als Chromophor binden. Die andere Hauptgruppe ist die der Rhodopsine vom Typ I. Sie sind mikrobiellen Ursprungs und das erste dieser Gruppe wurde 1973 in der Haloarchae *Halobacterium salinarum* entdeckt (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973). Dieser Fund führte zur Entdeckung weiterer Rhodopsin Paraloge in diesem Organismus und später in einer Vielzahl von Prokaryoten und niederer Eukaryoten wie Grünalgen (Nagel *et al.*, 2002) sowie vor allem Pilzen (Brown, 2004). Rhodopsine vom Typ I können in zwei Kategorien nach ihrer Funktion eingeteilt werden: Transporter und Rezeptoren. In der Kategorie der Transporter gibt es zum einen die Protonentransporter. Sie nutzen die Energie des Lichts zum Transport von Protonen und bauen so ein elektrochemisches Potential auf. Dieses Potential kann wiederum für die Produktion von ATP, Flagellenrotation oder andere Energie verbrauchende Prozesse genutzt werden. Diese Funktionen der Protonenpumpen konnten in Haloarchaea (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973), marinen Archaea (Frigaard *et al.*, 2006) und Bakterien (Balashov *et al.*, 2005) gezeigt werden. Solch eine Protonenpumpe konnte auch in dem Pilz *Leptosphaeria maculans* identifiziert werden, wobei ihre Funktion bis heute unklar bleibt (Waschuk *et al.*, 2005). Zum anderen existieren Chlorid-pumpende Rhodopsine. Diese Rhodopsintransporter beeinflussen ebenfalls den elektrochemischen Gradienten, indem sie Chlor-Ionen ins Zytoplasma pumpen und so die Zellmembran hyperpolarisieren (Spudich, 1998). Diese Art von Rhodopsinen wurden bislang nur in Archaea und Bakterien identifiziert (Matsuno-Yagi & Mukohata, 1977, Mongodin *et al.*, 2005). Zum anderen existieren Rezeptor-Rhodopsine. Diese werden nach ihrer Funktion in Beteiligung an Phototaxis oder Photoadaptation unterteilt. Rezeptor-Rhodopsine konnten jedoch in Pilzen bislang nicht nachgewiesen werden.

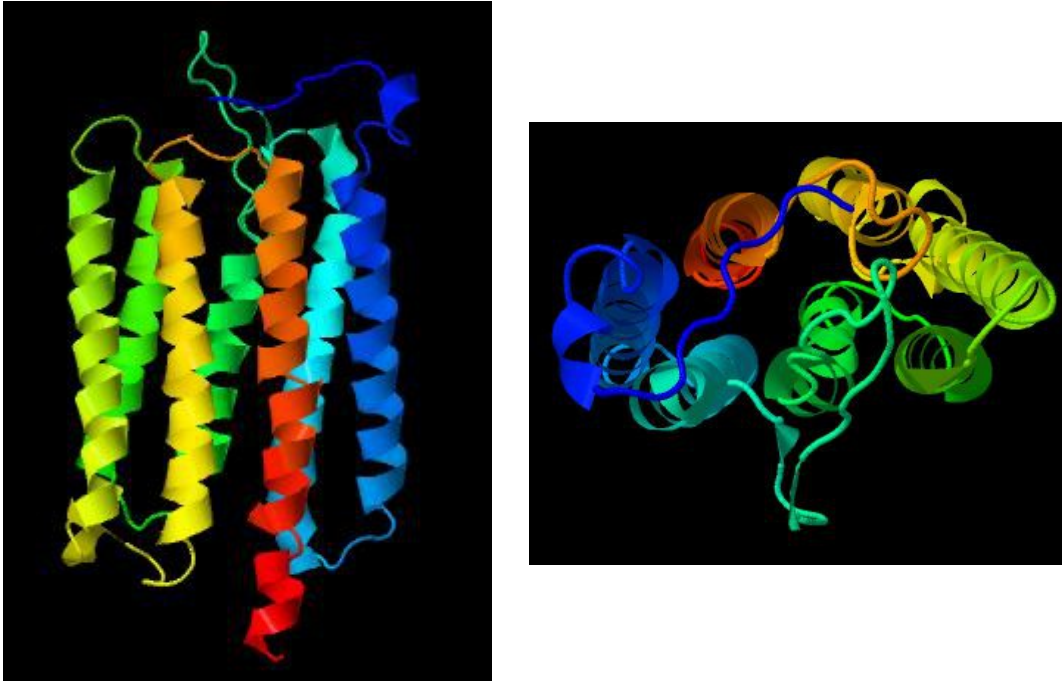


Abbildung 3: 3D-Modell der typischen Opsintertiärstruktur. Links: Ansicht von der Seite. Die Membran würde horizontal um das Protein verlaufen. **Rechts:** Ansicht von oben. Die Membran würde um das Protein herum verlaufen. Die sieben Transmembranhelices sind über drei cytoplasmatische und drei periplasmatische Schleifen verbunden, die in ihrer Länge variieren. In der Membran sind die Transmembrandomänen rund, zu einer Art Faserstruktur angeordnet. Der Retinal-Chromophor kann über ein konserviertes Lysin in der siebten oder G-Helix and das Opsin binden und würde sich im Kanal, inmitten des Proteins, befinden. Der N-terminale Schwanz ragt aus der Zelle heraus in den periplasmatischen Raum, der C-terminale Schwanz in die Zelle hinein, in das Cytoplasma. Das Modell wurde mit der 3D-Modellierungssoftware Phyre² erstellt. Dargestellt ist eines der Opsine aus *A. alternata*, OpsB, welches stellvertretend für die typische Opsintertiärstruktur ist.

Das erste Opsin in Pilzen, das den Typ I Rhodopsinen zugeordnet wurde, Nop-1, wurde im Modelorganismus für filamentöse Pilze *Neurospora crassa* 1999 von Bieszke *et al.* beschrieben und untersucht (Bieszke *et al.*, 1999a; Bieszke *et al.*, 1999b). Durch die steigende Verfügbarkeit von Genomsequenzdaten wurden in den folgenden Jahren vermehrt Opsine in den Genomen von Pilzen gefunden. Beispielhaft zu nennen ist hier NopA aus *Aspergillus nidulans*. NopA besitzt, an der Stelle des für die Chromophorbindung notwendigen Lysins, ein Glutamin, was die Bindung des Retinal-Chromophors an das Opsin unwahrscheinlich macht. Obwohl Opsine ähnliche Sequenzen und Strukturen aufweisen, sind ihre Funktionen und Vorkommen in den verschiedenen Domänen sehr divers. Vorallem in Pilzen ist ihr Vorkommen sehr unterschiedlich und reicht von keinem Opsin bis hin zu drei (**Abb. 4**). Über ihre Funktion in Pilzen ist kaum etwas bekannt. Der

Knockout des *nop-1*-Gens in *N.crassa* resultiert in frühzeitigem Eintritt in den sexuellen Zyklus des Stamms (Wang *et al.*, 2016). Die Inaktivierung des Nop-1 Homologs Sop1 in *Sclerotinia sclerotiorum* führte zu reduziertem Hyphenwachstum sowie Sklerotien Bildung und eingeschränkter Virulenz (Lyu *et al.*, 2015). In *Fusarium fujikuroi* und *Phaeosphaeria nodrum* wurden Opsine identifiziert, welche aktive, Grünlicht-abhängige Protonenpumpen sind (Fan *et al.*, 2011; Garcia-Martinez *et al.*, 2015) Die Deletion des Opsins CarO in *F. fujikuroi* resultierte in früherer Keimung der Sporen und schnellerem Wachstum (Garcia-Martinez *et al.*, 2015; Brunk *et al.*, 2018). In der Gegenwart von Indol-3-Essigsäure, Essigsäure, Glutamat und Glukonat zeigte CarO eine erhöhte Pumpaktivität (Garcia-Martinez *et al.*, 2015; Adam *et al.*, 2018). Das Genom des Mais-Pathogens *Ustilago maydis* kodiert für drei putative Opsine, die ebenfalls untersucht wurden. Während UmOps3 nur bei der Infektion der Pflanze exprimiert wird und keine Pumpaktivität zeigt, werden UmOps1 und UmOps2 auch außerhalb der Infektion und während des gesamten Lebenszyklus exprimiert. Darüberhinaus zeigten diese beiden Opsine Protonenpumpaktivität (Panzer *et al.*, 2019). Die Expression von UmOps2 konnte durch Blaulicht, Rotlicht und dunkelrotes Licht induziert werden, wohingegen die Expression von UmOps1 nur durch Blaulicht, jedoch nicht durch Rotlicht und dunkelrotes Licht induziert wurde. Die Blaulicht-abhängige Expression von UmOps1 ging im WC-1 Deletionsstamm verloren und legt eine mögliche Interaktion mit dem *white-collar* Komplex nahe. Die Expression von UmOps2 konnte im $\Delta wc-1$ -Stamm dennoch durch Blaulicht induziert werden, weshalb die Existenz eines weiteren Blaulichtrezeptors in *U. maydis* vermutet wurde, der die Abwesenheit von WC-1 kompensieren kann (Panzer *et al.*, 2019)

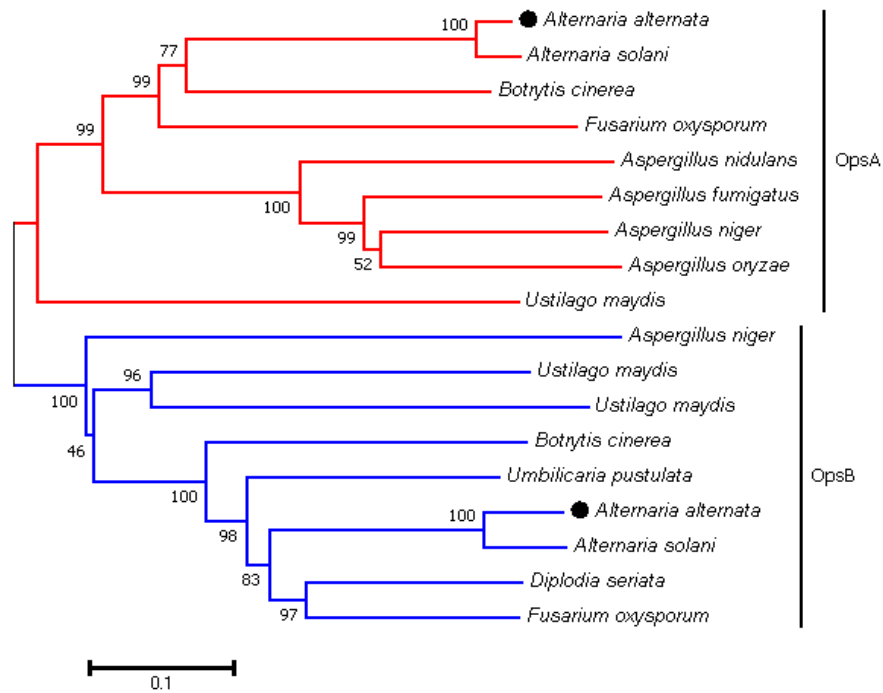


Abbildung 4: Stammbaum aus Opsin-Homologen verschiedener Vertreter der Ascomyceten und Basidiomyceten. Der Baum lässt sich in zwei Hauptäste gliedern: Opsine, die starke Homologie zu OpsA zeigen (rot) und Opsine, die näher mit OpsB verwandt sind (blau). Ihre jeweiligen Aminosäuresequenzen, also auch biochemischen Eigenschaften, sind demnach voneinander abgetrennt und konserviert. Die Vertreter der Opsine aus *A. alternata* sind mit einem schwarzen Punkt markiert. Der Baum wurde erstellt mit der Neighbour-Joining Methode (Saitou & Nei, 1987). Der prozentuale Anteil an Stammbaumreplikaten, in denen die assoziierten Taxa im Bootsrap Test (1.000 Replikate) kombiniert auftraten, sind neben den Ästen gezeigt (Felsenstein, 1985). Die evolutionären Entfernungen sind in der Einheit "unterschiedliche Aminosäuren pro Position" angegeben und wurden mit der *p-distance* Methode (Nei & Kumar, 2000) errechnet. Der Stammbaum wurde mit der Software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) erstellt.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die Opsine in *A. alternata* im Rahmen meiner Masterarbeit bereits untersucht (Pinecker, 2016). Das Genom von *A. alternata* kodiert für zwei Opsine, OpsA und OpsB. Das *opsA*-Gen ist 1035 bp lang, enthält zwei Introns und wird in ein 310 Aminosäuren langes Protein transkribiert und enthält das kritische Lysin zur Chromophorbinding in der siebten Transmembranhelix. *opsB* ist 1170 bp lang, enthält vier Introns und wird in ein 307 Aminosäuren langes Protein transkribiert. In Zusammenarbeit mit Ulrich Terpitz von der Universität Würzburg wurden OpsA und OpsB von ihm und seiner Arbeitsgruppe heterolog in der Säugetierzelllinie NG108-15 exprimiert und mittels *patch-clamp* Verfahren (*whole cell* Konfiguration) auf Protonenpumpaktivität untersucht (**Abb.5**). Beide Opsine waren in der Lage Protonen Grünlicht-abhängig aus dem Zellinneren heraus zu pumpen. Bei einem Membranpotential von 0 mV zeigte OpsA eine Pumpaktivität von ca. 440 pA und OpsB von ca. 200 pA.

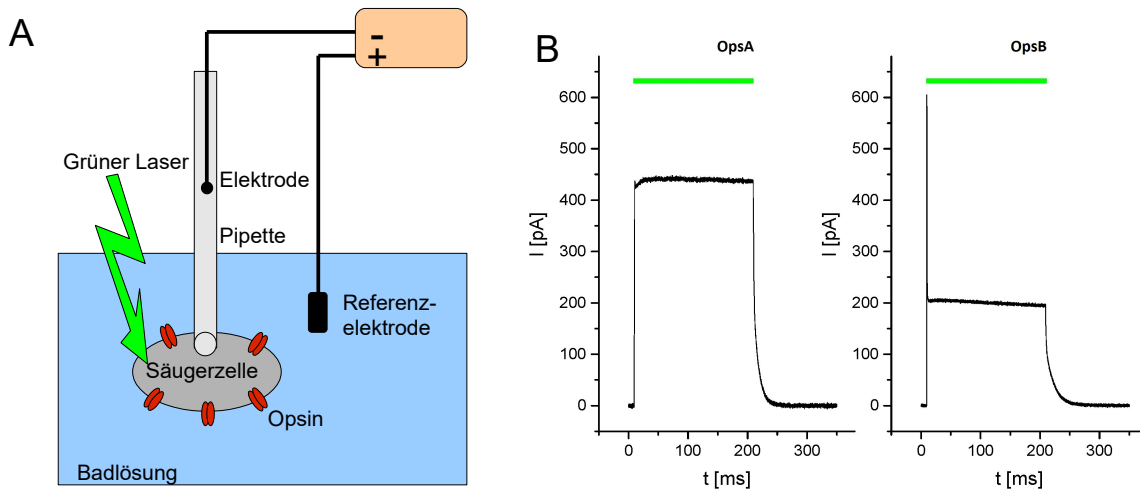


Abbildung 5: Untersuchung der Pumpaktivität von OpsA und OpsB mittels patch-clamp Verfahren. A: Aufbau der patch-clamp Messung in der whole cell Konfiguration. Durch die Öffnung der Zelle innerhalb des Pipettenkontakts bilden Zellinneres und Pipetteninneres ein durchgängiges System, wodurch das Potential an der gesamten Membran gemessen werden kann. Badlösung: 140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ und 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) pH 7,4. **B:** Diagramm des gemessenen Spannungspotentials bei 0 mV Membranpotential. Die Zellen wurden mit einem *diode pumped solid state* (DPSS)-Laser bei 532 nm und ca. 10 mW/mm² bestrahlt. Der grüne Balken repräsentiert die Bestrahlungszeit. Die Messung erfolgte am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg und die Abbildung wurde von Dr. Ulrich Terpitz zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Der *White Collar* Komplex

Alle Pilze, die auf Licht reagieren, zeigen eine starke Reaktion auf den blauen und nah-UV-A Bereich. In Pilzen wurden einige Blaulichtrezeptoren identifiziert. Das sind Cryptochrome, Photolyasen und die kleinen LOV (Light Oxygen Voltage) Domänen Proteine VIVID und ENVOY. Die scheinbar wichtigsten Blaulichtrezeptoren sind WC-1 und WC-2. WC-1 wurde zuerst in *N. crassa* identifiziert und untersucht. Das Protein bindet den Chromophor Flavin-Adenin Dinukleotid (FAD) (Froehlich *et al.*, 2002). Dieser Blaulichtrezeptor ist ein Transkriptionsfaktor und kann mit seiner Zinkfingerdomäne mit DNA interagieren (He *et al.*, 2002). Neben der Zinkfinger DNA-Bindedomäne besitzt WC-1 drei sogenannte PAS (Per-Arrnt-Sim) Domänen, von denen eine zu der Unterklasse der LOV Domänen gehört und den Chromophor FAD bindet (**Abb. 6**). Mittels der PAS Domänen interagiert WC-1 mit einem weiteren Protein, WC-2, und formt so mit ihm zusammen den Heterodimer *White Collar Complex* (WCC). WC-2 besitzt ebenfalls eine Zinkfingerdomäne zur Interaktion mit DNA, allerdings keine LOV Domäne. So kann WC-2 nicht direkt als Blaulichtrezeptor fungieren, ist jedoch essentiell für die Blaulichwahrnehmung (Linden *et al.*, 1998, Linden & Macino, 1997). Das Lichtsignal wird

durch den WCC in Veränderungen in der Genexpression umgesetzt, indem er an spezifischen Sequenzen in den jeweiligen Promotoren lichtregulierter Gene, den sogenannten *Light Response Elements* (LREs) bindet. Wird dann ein Blaulichtphoton von FAD absorbiert, vollzieht WC-1 eine Konformationsänderung wodurch der WCC als Transkriptionsfaktor aktiv wird und die Expression von Genen induziert (Froehlich *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass der WCC in *N. crassa* ausschließlich als transkriptioneller Aktivator fungiert, wohingegen er in anderen Pilzen wie *A. nidulans* (Bayram *et al.*, 2010), *Fusarium graminearum* (Kim *et al.*, 2014) und auch *A. alternata* (Pruß *et al.*, 2014) ebenfalls die gegenteilige Rolle übernehmen kann und die Expression mancher Gene reprimiert. In *N. crassa* wurde ein weiterer, sehr interessanter Aspekt von WC-1 entdeckt. Revina *et al.* konnten zeigen, dass WC-1 einen großen Einfluss auf die elektrischen Eigenschaften der Plasmamembran hat, indem ein $\Delta wc-1$ -Stamm ein niedrigeres Membranpotential und einen größeren Eingangswiderstand der Membran aufwies, als der Wildtyp, wenn beide in Dunkelheit kultiviert wurden. Im Wildtyp zeigten Membranpotential und Eingangswiderstand eine Veränderung auf Bestrahlung mit Blaulicht. Dieser Effekt ging im $\Delta wc-1$ -Stamm verloren (Potapova *et al.*, 1988). Später wurde gezeigt, dass Blaulichtbestrahlung zu einer Erhöhung des K⁺ Efflux, Cl⁻ Influx, sowie einer Verringerung des H⁺ Influx führt, was in einer Hyperpolarisierung der Plasmamembran resultiert (Levina *et al.*, 2002). *A. alternata* besitzt ebenfalls Orthologe zu WC-1 und WC-2 (Pruß *et al.*, 2014).

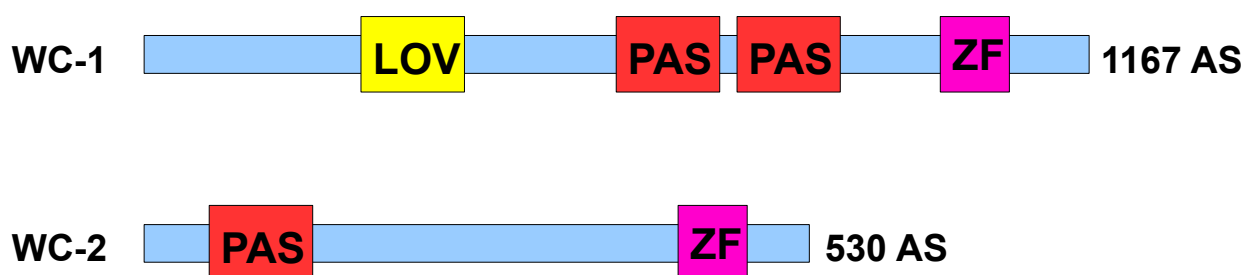


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *white collar* Proteine aus *N. crassa*. WC-1 enthält eine LOV (Light Oxygen Voltage) Domäne, die den Chromophor FAD (Flavin-Adenin Dinukleotid) bindet, zwei PAS (Per-Arnt-Sim) Domänen zur Protein-Protein Interaktion, sowie eine DNA-bindende Zinkfinger (ZF) Domäne. WC-2 besitzt eine PAS Domäne und eine Zinkfinger Domäne. Die beiden *white collar* Proteine interagieren miteinander und bilden den *white collar* Komplex.

2.2.3 Phytochrom

Phytochrome sind Rezeptoren für rotes und dunkelrotes Licht. Sie sind in Bakterien und Pflanzen weit verbreitet, in Pilzen jedoch nur sporadisch verteilt und kommen hauptsächlich in Ascomyceten und Basidiomyceten vor (Rottwinkel *et al.*, 2010; Fuller *et al.*, 2015; Lamparter *et al.*, 2017). 2005 wurde das erste Phytochrom in einem Pilz, nämlich *A. nidulans*, experimentell charakterisiert (Blumenstein *et al.*, 2005) und ihm konnte eine Repressorfunktion in der sexuellen Entwicklung nachgewiesen werden. Phytochrome existieren, abhängig von der wahrgenommenen Wellenlänge in einer inaktiven Form (P_i) und können durch Bestrahlung mit Rotlicht in eine aktive Form (P_{fr}) überführt werden. Durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht kann der Effekt revertiert werden. Diese Rotlichtrezeptoren bestehen aus einer N-terminalen sensorischen Domäne und einer C-terminalen Output-Domäne (**Abb. 7**). Die Sensordomäne besitzt eine PAS Domäne in welcher der Bilin-Chromophor an ein konserviertes Cystin kovalent binden kann (Brandt *et al.*, 2008). Der C-Terminus des *A. nidulans* Phytochrom FphA interagiert mit dem WC-2 Ortholog LreB. Genauer gesagt interagiert LreB mit der Responseregulator- und der Histidin-Kinase-Domäne (HK). Die HK-Domäne ist an die Phytochrom-Domäne (Phy) gekoppelt und interagiert darüber hinaus mit VeA, einem Masterregulator für Entwicklung und Sekundärmetabolismus. Desweiteren beinhalten FphA und weitere Phytochrome aus Pilzen eine ATPase, welche Anteil an der Autophosphorylierung hat sowie eine GAF-Domäne, welche in Phytochromen allgemein vorkommt.

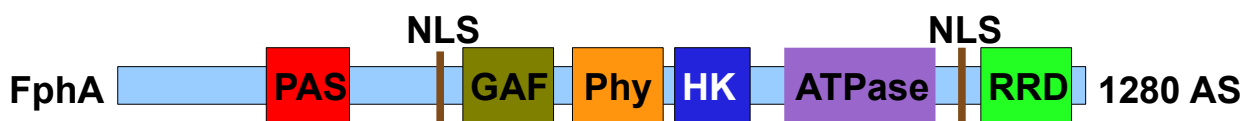


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänenanordnung von FphA (Fungal phytochrome A) aus *A. nidulans*. In der N-terminalen Sensordomäne befindet sich eine PAS-Domäne in welcher der Chromophor binden kann. Es folgt eine GAF-Domäne, hier können kleine Liganden gebunden werden. Die Phy-Domäne bestimmt die photo-chemischen Eigenschaften des Phytochroms mit. Es folgt die N-terminale Output-Domäne, bestehend aus einer Histidinkinase (HK), einer ATPase, welche Anteil an der Autophosphorylierung hat, und einer Responseregulator-Domäne.

2.3 Der cAMP-PKA Signalweg

Der cAMP-PKA Signalweg ist in filamentösen Pilzen konserviert und steuert viele biologische Prozesse, die ebenfalls von Licht beeinflusst werden, weshalb eine indirekte Überschneidung mit der Lichtwahrnehmung gegeben ist (Lengeler *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019). Zyklisches Adenosin 3',5'-Monophosphat (cAMP) war der erste sekundäre Botenstoff der identifiziert wurde (Sutherland & Rall, 1958). Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wird reguliert durch das Zusammenspiel der Aktivitäten zweier Enzyme: Adenylatzyklase (AC) und die zyklische Nukleotidphosphodiesterase (PDE). Eine große Anzahl an Genen kodieren für verschiedene Isoformen dieser Enzyme. Die entsprechenden Gene werden sehr unterschiedlich exprimiert und von verschiedenen Mechanismen reguliert, wodurch dieser Signalweg an verschiedene Zelltypen und Stimulus-spezifische Reaktionen angepasst wird (McKnight, 1991). Die meisten ACs werden durch die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Protein Komplexes von einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) aktiviert. Die aktivierte AC synthetisiert cAMP, welches wiederum viele verschiedene Effektoren aktivieren kann. Der am besten untersuchten Effektor ist die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) (Pierce *et al.*, 2002). In seiner inaktiven Form liegt PKA als Tetramer vor, bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten die an zwei regulatorische Untereinheiten gebunden sind. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels führt dazu, dass cAMP an die regulatorischen Untereinheiten binden, diese von den katalytischen Untereinheiten dissoziieren und die PKA so aktiviert wird (Taylor *et al.*, 1992). Wird PKA aktiv, vermittelt es Zellfunktionen durch die Phosphorylierung von Proteinen, wie metabolische Enzyme und Transkriptionsfaktoren (**Abb. 8**).

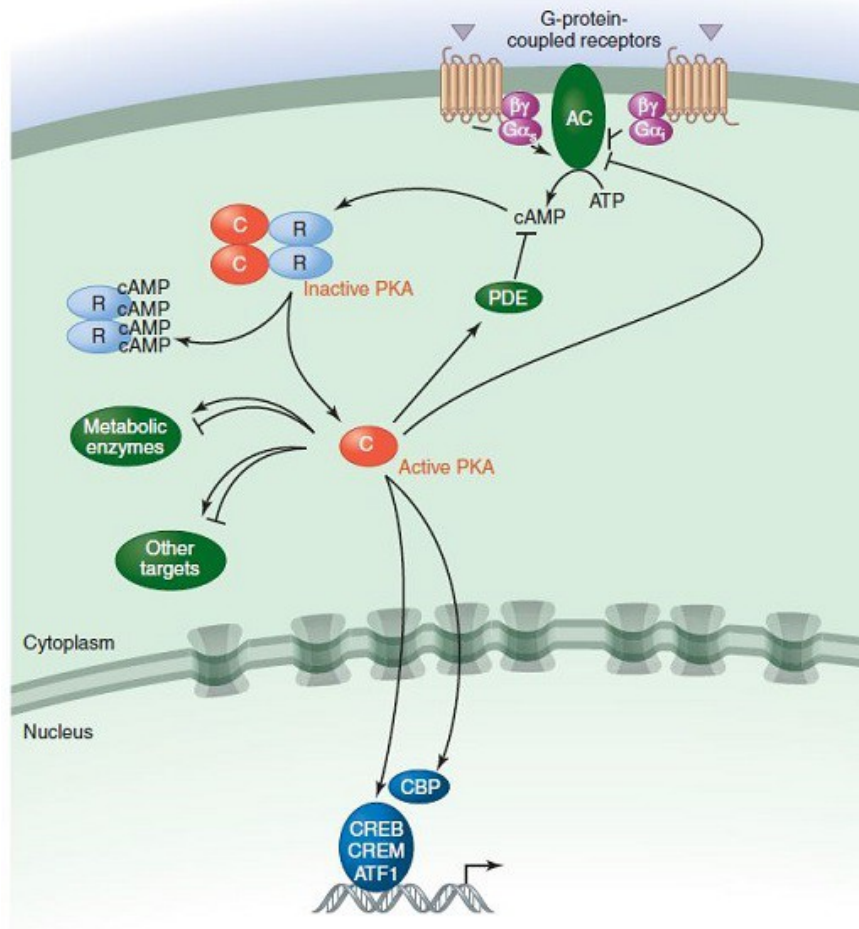


Abbildung 8: Schematische Darstellung der cAMP-abhängigen Aktivierung von PKA. Die Aktivierung einer Adenylatzyklase (AC) führt zur Synthese von cAMP. Bei hohem cAMP-Spiegel bindet der sekundäre Botenstoff an die regulatorischen Untereinheiten der PKA, wodurch diese von den katalytischen Untereinheiten dissoziieren und diese so aktiv werden. PKA leitet das Signal in der Regel durch Phosphorylieren von metabolischen Enzymen und Transkriptionsfaktoren weiter. Die Feinabstimmung des cAMP-PKA Signalwegs wird durch alternative G-Proteine bewerkstelligt, welche die AC hemmen sowie der zyklischen Nukleotidphosphodiesterase (PDE), die cAMP degradiert. (Cold Spring Harb Perspect Biol 2012)

Durch Bindung eines alternativen G-Proteins im G-Protein Komplex eines GPCR kann die Aktivität der AC gehemmt werden. Eine weitere Form der negativen Regulation der AC ist die Degradierung von cAMP durch PDE. Sowohl ACs als auch PDEs werden von zahlreichen anderen Signalwegen positiv und negativ reguliert (**Abb. 9**). Beispielhaft zu nennen sind der Kalzium Singalweg, Untereinheiten von G-Proteinen, Inositol Lipide (durch PKC) und Rezeptor Tyrosin Kinasen durch die ERK MAP Kinase und PKB) (Yoshimasa *et al.*, 1987; Bruce *et al.*, 2003; Goraya & Cooper, 2005). So ergibt sich ein

komplexes Netzwerk verschiedener Signalwege, die den cAMP-PKA Signalweg beeinflussen. Die Aktivität der katalytischen Untereinheit von PKA kann durch einen Protein Kinase Inhibitor (PKI) verringert werden, der ebenfalls in der Lage ist PKA aus dem Zellkern zu exportieren und so die Funktionen von PKA im Zellkern negativ zu regulieren. Eine weitere wichtige Gruppe, die zur Spezifität der cAMP-abhängigen Signaltransduktion beiträgt, ist die Familie der PKA-Verankerungsproteine (AKAPs). Sie sind in der Lage, PKAs in räumliche Nähe bestimmter Effektoren oder Substrate oder sie an bestimmte subzelluläre Orte zu bringen und sie an ACs oder PDEs zu verankern und somit eine rasche, lokale Aktivierung der PKA oder lokale negative Rückkopplungsschleifen zu erzeugen (Wong & Scott, 2004).

In *S. cerevisiae* sind AC und PKA Schlüsselenzyme zur Signaltransduktion des Glukoserezeptors Gpr1, sowie einer Reihe von Stressantworten (Nakafuku et al., 1988, Thevelein & de Winde, 1999, Tamaki, 2007). Die PKA spielt eine zentrale Rolle in vielen Zellfunktionen wie Wachstum, Stressantwort sowie Akkumulation und Speicherung von Glykogen und Trehalose. Letzteres spielt wiederum eine Rolle in der Auskeimung der Sporen von *A. nidulans* (Fillinger et al., 2002).

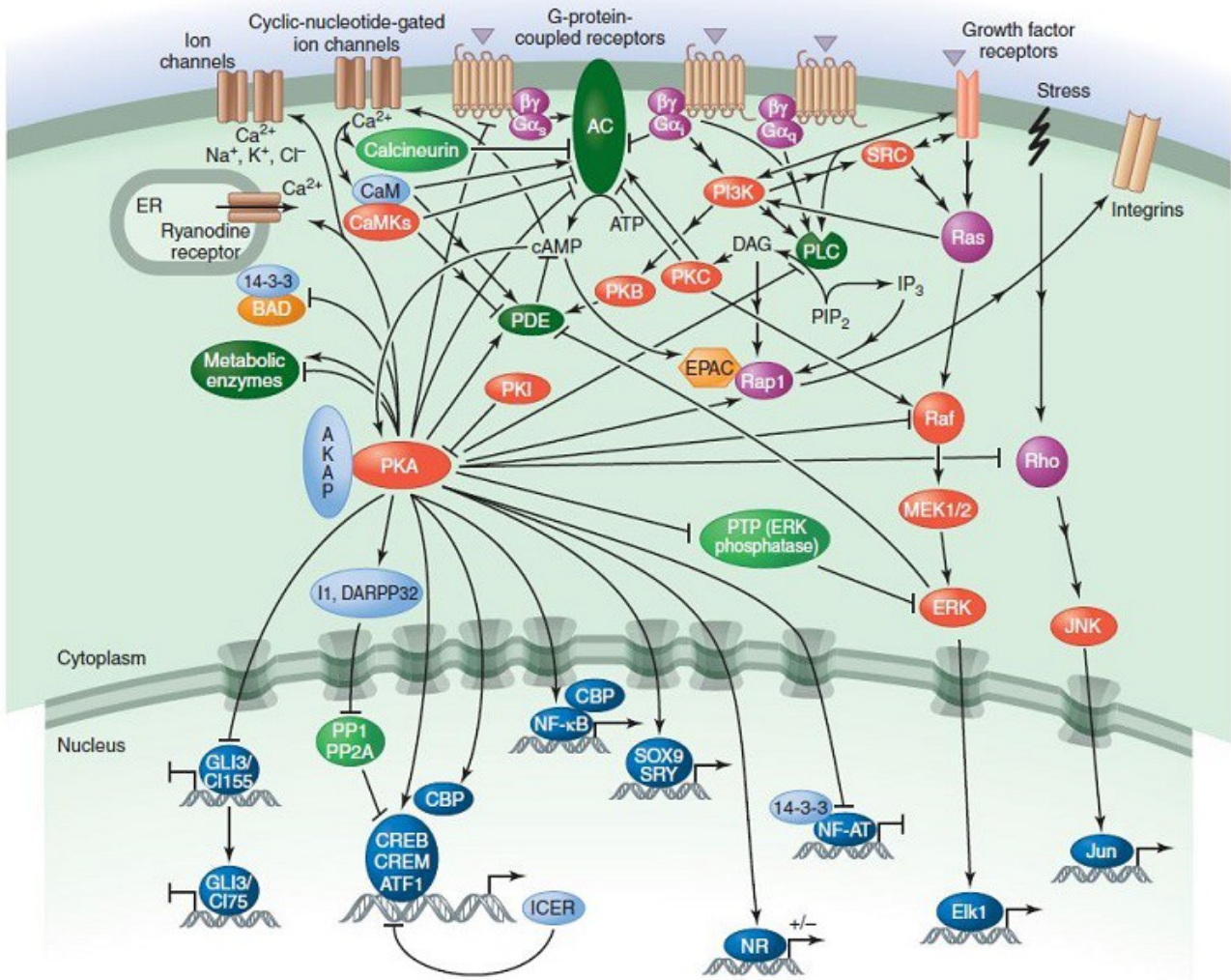


Abbildung 9: Der cAMP-PKA Signalweg ist Teil eines komplexen Signal- und Regulationsnetzwerks. Die Feinabstimmung der Signaltransduktion von cAMP und PKA wird von einer Vielzahl an Proteinen bewerkstelligt, die wiederum selbst an verschiedenen Stellen reguliert werden. PKA beeinflusst die Aktivität vieler metabolischen Enzyme sowie Transkriptionsfaktoren im Zellkern. (Cold Spring Harb Perspect Biol 2012)

2.4 Der HOG Signalweg

Ein weiterer wichtiger, in filamentösen Pilzen konservierter Signalweg, ist der Stress-aktivierte HOG Signalweg. Der HOG (High-osmolarity glycerol) Signalweg wurde zuerst als Signalweg der Osmoregulation identifiziert (Brewster *et al.*, 1993). Später konnten viele Faktoren mit diesem Signalweg in Verbindung gebracht werden, darunter die Zellantwort auf Zitronensäure, Hitze- und Kältestress, Integrität der Zellwand, Regulation des Zellzyklus, Ionentransport an Membranen sowie die Regulation von Transkriptions- und Translationsereignissen (Lawrence *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2002; Bilsland *et al.*, 2004; Hayashi & Maeda, 2006; Panadero *et al.*, 2006; Martinez-Montanes *et al.*, 2010; de Nadal & Posas, 2015). Der HOG Signalweg ist ein MAP (mitogen-activated protein) Kinase Kaskaden-Signalweg, bei dem das Signal eines Rezeptors via Phosphorylierungskette durch MAPKK Kinase, MAPK Kinase und schließlich MAP Kinase in den Zellkern gelangt und dort durch Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen beeinflusst (Qi & Elion, 2005; Raman *et al.*, 2007; Keshet & Seger, 2010). In der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* wurde gezeigt, dass die MAPK des HOG Signalswegs Spc1, nachdem sie phosphoryliert wurde, in den Zellkern transportiert wird und dort den Transkriptionsfaktor Atf1 phosphoryliert, der wiederum für Funktionen wie Meiose und die osmotische Stressantwort verantwortlich ist (Shiozaki & Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996). In den filamentösen Pilzen *N. crassa*, *A. nidulans*, *C. lagenarium* und *M. grisea* ist der HOG Signalweg weitgehend in die Reaktion auf osmotischen und oxidativen Stress, Entwicklung und Virulenz involviert (Eaton *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2012; Lamb *et al.*, 2012; Van Nguyen *et al.*, 2013; Nimmanee *et al.*, 2015). Das MAPK Homolog aus *A. nidulans*, Saka, wird als Reaktion auf Nährstoffmangel, Sauerstoffmangel und Licht phosphoryliert (Fischer *et al.*, 2016, Lara-Rojas *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2016). Die Deletion von *sakA* führte zum Verlust der lichtabhängigen Expression des Gens *ccgA* und legt deshalb eine Interaktion von Licht mit HOG Signalweg nahe. Weiterhin führte die Deletion zu einer frühen Produktion der sexuellen Kleisothezien und einem Defekt in der Bildung asexueller Sporen (Yu *et al.*, 2016).

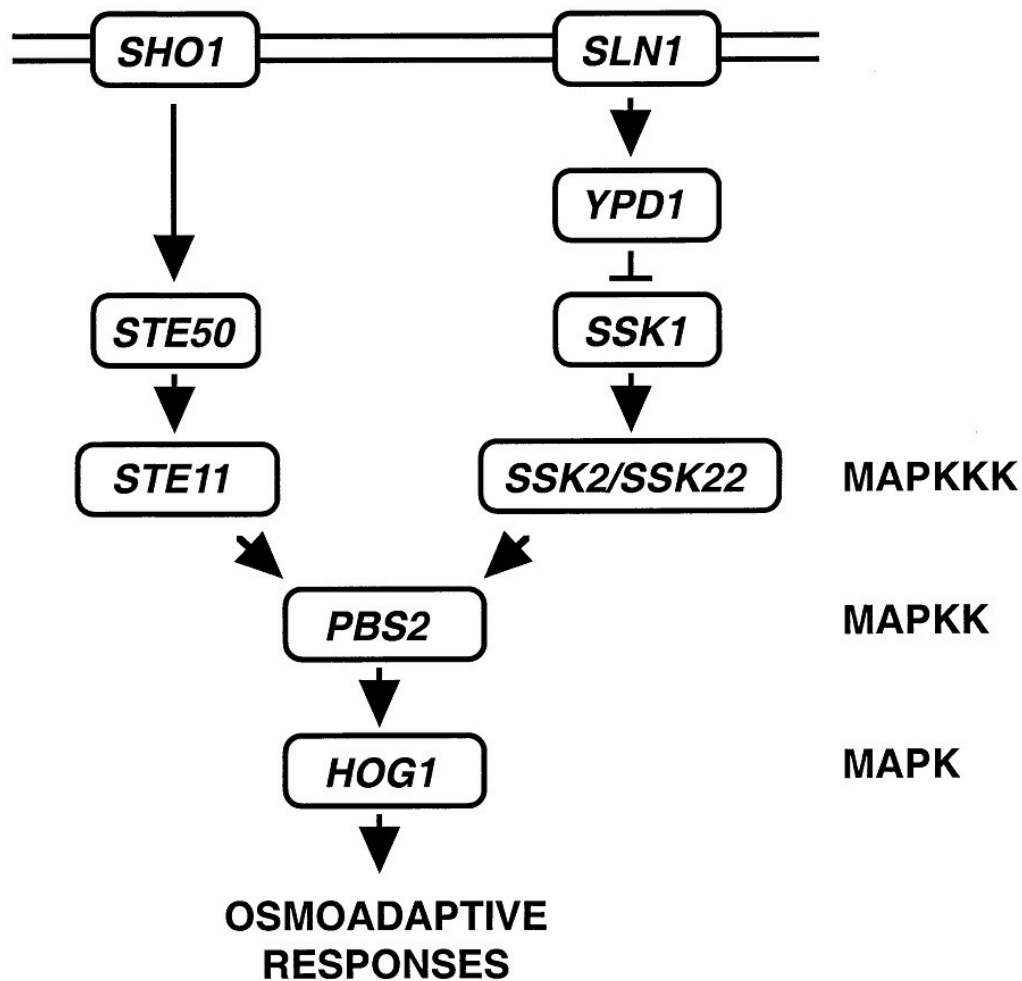


Abbildung 10: Vereinfachte schematische Darstellung des HOG Signalwegs aus *S. cerevisiae*. Das Signal wird von meist membranständigen Rezeptoren weitergeleitet, bis es die Phosphorylierungskaskade der Kinasen erreicht. Die MAP Kinase HOG1 wird nach der Phosphorylierung in den Zellkern transportiert und überträgt dort das Signal auf Transkriptionsfaktoren (Posas *et al.*, 1998).

2.5 CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 ist in der Natur Teil des Immunsystems von Bakterien und Archaeen (van der Oost *et al.*, 2009; Horvath & Barrangou, 2010). Hier wird es genutzt um sich vor eingeschleuster viraler DNA zu schützen. CRISPR steht für Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und beschreibt eine Art DNA-Bibliothek, die im Genom der Bakterien oder Archaeen angelegt wird und aus einer Reihe von 20 bp Nukleotidsequenzen, der sogenannten Protospacer besteht, und Teile der viralen DNA waren. Diese Protospacer-Sequenzen werden aus dem eigenen Genom in RNA transkribiert und in eine Endonuklease, dem Cas-Protein eingebaut. Die Cas-Endonuklease rastert dann DNA nach komplementären Sequenzen ab und führt, falls eine

vorhanden ist, zwischen der 16. und 17. Base der komplementären Protospacersequenz einen Doppelstrangbruch ein. Dabei kann das Cas zwischen eingeschleuster DNA und der eigenen CRISPR-DNA unterscheiden, indem eingeschleuste DNA direkt angrenzend an den Protospacer in 3'-Richtung eine weitere kurze Sequenz, das PAM (Protospacer Adjacent Motif), besitzt, welches im CRISPR Bereich fehlt. Im Fall der *Streptococcus pyogenes* Cas-Endonuklease Cas9 ist das PAM die Drei-Basen-Folge NGG, wobei das N eine variable Base ist. Seit der Entdeckung des CRISPR/Cas Systems wurde es umfangreich untersucht und zum effektiven System zur Genomeditierung weiterentwickelt. Mittlerweile wurden CRISPR/Cas Systeme entwickelt, um verschiedene Organismen wie Hefe (DiCarlo *et al.*, 2013), Pflanzen (Belhaj *et al.*, 2013), Zebrafische (Hwang *et al.*, 2013) und sogar Säugerzellen (Cong *et al.*, 2013) gentechnisch zu modifizieren. Auch für filamentöse Pilze verspricht CRISPR/Cas ein enormes Potential als Werkzeug für gentechnische Arbeiten. Neue, vielversprechende Werkzeuge für gentechnische Arbeiten in Pilzen sind von großem Interesse. Dadurch dass Genomsequenzierungen günstiger und schneller durchgeführt werden können, werden immer mehr Genomdaten verschiedener Pilze verfügbar und ermöglichen somit theoretisch gentechnische Arbeiten mit vielen verschiedenen Organismen. Methoden für genetische Manipulationen gibt es jedoch nur für etablierte Modellorganismen und somit nur für eine geringe Anzahl an Pilzen. Eine gängige Methode für die Inaktivierung eines Gens ist die Transformation mit einer Deletionskassette, die einen Selektionsmarker und flankierende Sequenzen beinhaltet, die homolog zum Zielgen sind. Mittels homologer Rekombination, ein zelleigener Mechanismus zur Reparatur von DNA-Schäden, wird die Deletionskassette in den jeweiligen Locus eingebaut und somit das Zielgen durch den Selektionsmarker ersetzt. Diese Methode führte bei *A. alternata* selten zum Erfolg, da er mehrkernige Zellen besitzt und die Kassette häufig nicht in allen Kernen vorhanden war. Zusätzlich waren *A. alternata* Transformanten des öfteren Heterokaryen, da die Kassette nicht immer homolog integrierte und somit auch Kerne mit ektopisch integrierten Kassetten vorhanden waren. Nodvig *et al.* haben ein CRISPR/Cas9-System zur Gen-Inaktivierung in filamentösen Pilzen entwickelt, das diese Probleme umgeht (Nodvig *et al.*, 2005). Damit kann der zu manipulierende Pilz mit einem selbstreplizierenden Plasmid transformiert werden, wodurch eine Integration, vorallem an einen Locus gebundene, nicht mehr notwendig ist. Das System ist auch vergleichbaren Alternativen (Zink-Finger assoziierte Systeme und TALENS) überlegen, da hier für jedes Zielgen häufig die Modifikation des gesamten Proteins notwendig ist. Im CRISPR/Cas9-System muss lediglich die 20 bp

Protospacersequenz auf das Zielgen angepasst werden, die dann in einem sogenannten single-guide RNA (sgRNA) *backbone* in das Cas9-Protein integriert wird (**Abb. 11 A**). In etablierten CRISPR/Cas-Systemen werden zur Transkription der sgRNA Typ III-Polymerase-Promotoren benutzt, da diese die RNA nicht mit einer Cap-Struktur und einem Poly-A Schwanz, welche die Funktionalität beeinträchtigen, versehen. (Gao & Zhao, 2014). Da Promotoren, die von Typ III-Polymerasen genutzt werden in Pilzen nur unzulänglich beschrieben sind, sind solche Systeme für Pilze ungeeignet. Dieses Problem wurde von Nodvig *et al.* umgangen, indem die sgRNA von zwei Ribozymen flankiert wird, welche sich nach der Transkription abspalten und so die sgRNA freisetzen (**Abb. 11 B**). Demnach können in diesem System für Pilze etablierte Promotoren verwendet werden. Wird nun im Zielgen des Organismus von der Cas9 ein Doppelstrangbruch eingeführt, so wird dieser meistens mittels *non-homologous end joining* (NHEJ) repariert. Dabei treten gelegentlich Fehler auf, die zu unterschiedlich großen Deletionen oder Insertionen führen (**Abb. 11 C**). Daraus resultiert häufig eine Verschiebung im Leseraster des ORF, sodass sich die Aminosäuresequenz ändert und die Translation meistens frühzeitig abbricht, da durch die Verschiebung weitere Stop-Codons eingeführt werden. Alternativ kann der Doppelstrangbruch über homologe Rekombination repariert werden. Werden entsprechende homologe Sequenzen, die einen Selektionsmarker flankieren, mittransformiert, kann auch auf diesem Weg der ORF unterbrochen werden (**Abb. 11 C**). In beiden Fällen ist das Resultat die Inaktivierung des Zielgens. Wird der Doppelstrangbruch richtig repariert, ist die Protospacersequenz im Gen wiederhergestellt und weiterhin Ziel der Cas9. Cas9 ist bei der Interaktion mit der Zielsequenz sehr spezifisch, weshalb ungewollte Mutationen im Genom, durch dem Protospacer ähnliche Sequenzen, unwahrscheinlich sind. CRISPR/Cas9 scheint ein hervorragendes System zu sein, um Pilze, die keine etablierten Modellorganismen sind und für die es keine effizienten Methoden zur genetischen Manipulation gibt, für gentechnische Arbeiten und *loss-of-function* Studien zugänglich zu machen. Darüber hinaus kann mithilfe dieses Systems Auxotrophien in solche Pilze eingeführt werden um sie so für verschiedene weitere Methoden geeignet zu machen.

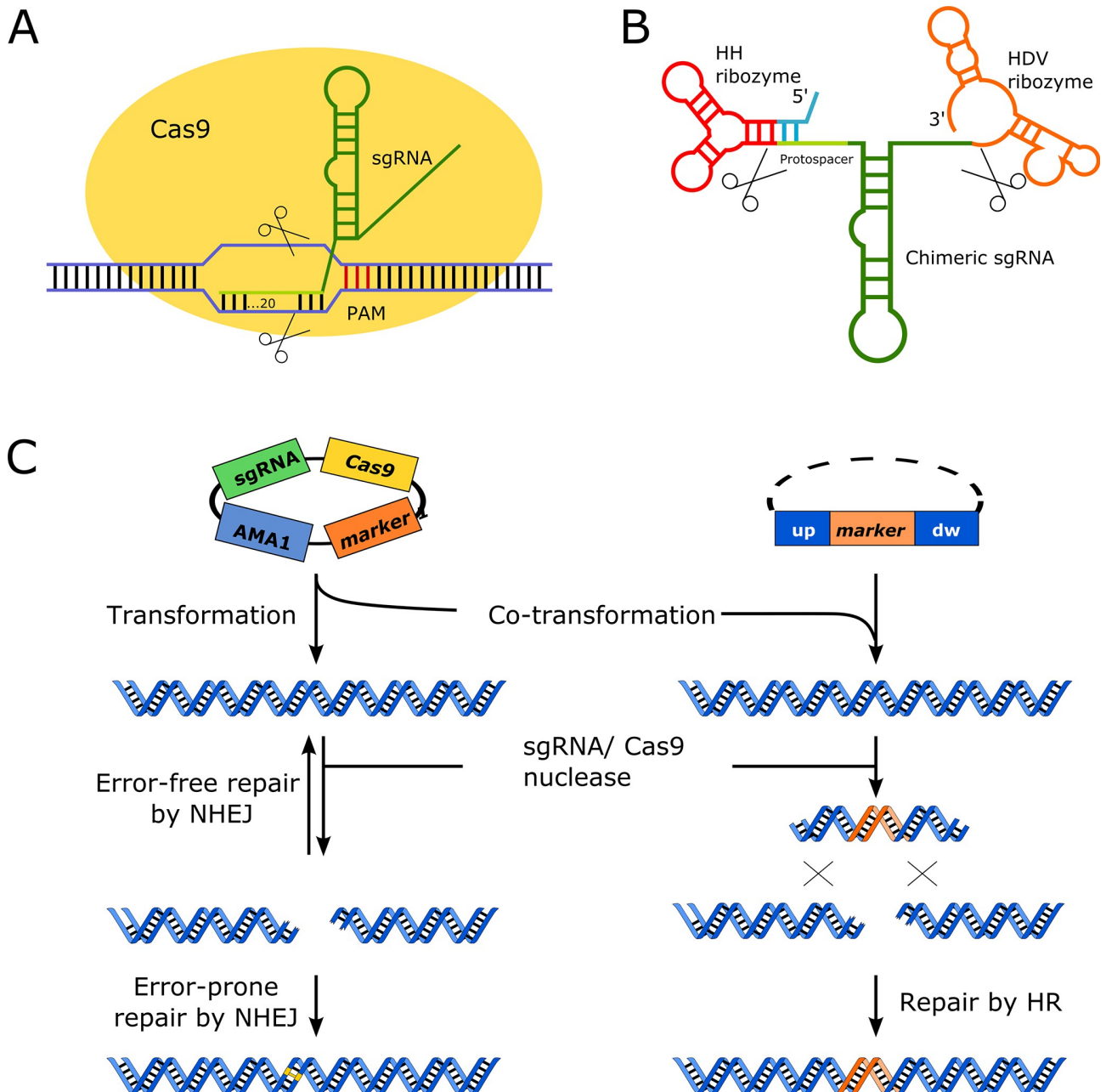


Abbildung 11: Bestandteile des CRISPR/Cas9-Systems nach Nodvig et al.. **A:** Schema der Funktionsweise von Cas9. Durch den 20 Nukleotide langen Protospacer (hellgrün) in der single-guide RNA (dunkelgrün) wird die Cas9 zur komplementären Sequenz des Protospacers im Genom geführt. Zwischen des 16. und 17. Nukleotids der zum Protospacer komplementären Sequenz führt Cas9 einen Doppelstrangbruch ein (durch die Scheren dargestellt). Dies ist jedoch nur der Fall, wenn das Protospacer Adjacent Motif (PAM) downstream des Protospacers vorhanden ist. **B:** Da sgRNA keine Cap-Struktur und keinen Poly-A Schwanz haben sollte und von Typ III Polymerasen genutzte Promotoren in filamentösen Pilzen nur unzulänglich beschrieben sind, ist die sgRNA von einem Hammerhead (HH) Ribozym (rot) und einem Hepatitis Delta Virus (HDV) Ribozym flankiert, welche sich abspalten und so die sgRNA freigeben. **C:** Der von Cas9 eingeführte Doppelstrangbruch kann über zwei Mechanismen repariert werden. Beim *non-homologous end joining* werden die beiden Enden der DNA wieder aneinander gefügt. Dabei kann es zu Fehlern kommen, bei denen Deletionen oder Insertionen auftreten, die das Leseraster verschieben und so das Gen seine Funktionalität verliert. Die Reparatur durch homologe Rekombination kann sich zu nutze gemacht werden, indem ein Marker mit flankierenden, homologen Sequenzen mittransformiert wird und der Marker so das Zielgen ersetzt.

2.6 Ziel dieser Arbeit

Licht wird von den meisten filamentösen Pilzen wahrgenommen und reguliert grundlegende biologische Prozesse wie Entwicklung, Morphogenese, Sporulation, Wachstum, Stresstoleranz, Metabolismus und Virulenz. Die Blaulicht- und Rotlichtwahrnehmung in Pilzen ist schon lange in der Forschung etabliert und entsprechend viele Studien haben sich damit befasst. Das Interesse an der Grünlichtwahrnehmung und den entsprechenden potentiellen Grünlichtrezeptoren in filamentösen Pilzen ist erst in den letzten 10 Jahren massiv gestiegen. Dabei ist die biologische Funktion von Grünlicht und Opsinen in Pilzen bis heute nicht eindeutig geklärt. Das Genom von *Alternaria alternata* enthält Sequenzen für zwei putative Opsine, deren Funktion und Rolle in der Entwicklung untersucht werden sollen.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems

Um bestimmte Gene zu untersuchen, ist es üblich, diese zu inaktivieren. Eine etablierte Methode ist die Transformation einer Markerkassette, die von homologen Sequenzen flankiert wird und so mittels homologer Rekombination das Zielgen ersetzt. Bei dem genetischen Marker kann es sich um einen dominanten Marker, also ein Resistenzgen, handeln, sodass positive Transformanten durch Zugabe eines Antibiotikums im Medium selektiert werden können. Der Nachteil ist, dass dominante Marker den Organismus, obwohl er eine Resistenz besitzt, beeinflussen. Das macht Untersuchungen des mutierten Stammes unter guter wissenschaftlicher Praxis unmöglich. Alternativ werden häufig Laborstämme benutzt, in deren Genom zuvor ein essentielles Gen des Primärmetabolismus inaktiviert wurde. Diese Stämme können durch Supplementierung der entsprechenden Stoffe kultiviert werden. In diesem Fall ist der Marker das essentielle Gen und die Selektion erfolgt dadurch, dass positive Transformanten ohne Supplement des entsprechenden Stoffs wieder überlebensfähig sind. Von *A. alternata* existieren bislang jedoch keine auxotrophen Stämme.

Die Entwicklung des CRISPR/Cas9 Systems für filamentöse Pilze (Nodvig *et al.*, 2015) hat das Potential effiziente Methoden zur genetischen Manipulation in *A. alternata* zu etablieren. Die folgenden Arbeiten zur Etablierung des CRISPR/Cas9 Systems wurden gemeinsam mit Maximilian Wenderoth durchgeführt. Dabei hat Herr Wenderoth die Inaktivierung von *brm2* sowie die Sequenzanalysen der *brm2*-Mutationsstämme durchgeführt. Weiterhin wurde die Generierung des Uracil/Uridin-auxotrophen *A. Alternata* Stamms von Herrn Wenderoth durchgeführt. Die Etablierung der molekularbiologischen Methoden einschließlich der Umstellung auf *Gibson-assembly* wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Wenderoth und Benjamin Voß durchgeführt. Die Inaktivierung von *pksA*, die Sequenzanalyse des $\Delta pksA$ Stamms, die Untersuchung der Cas9-Aktivität über mehrere Generationen sowie die Erprobung des Markerrecyclings wurden von mir durchgeführt. Herr Wenderoth übernahm etwa zwei Drittel der Etablierung des CRISPR/Cas9 Systems in *A. alternata*.

Zur Untersuchung der Eignung des CRISPR/Cas9 Systems in *A. alternata* wurden die Plasmide pFC330, pFC332 und pFC334 verwendet. Auf pFC334 befindet sich die sgRNA Kasette mit einem Protospacer aus dem Gen *yA* aus *A. nidulans*. Der Vektor dient als Template um mittels PCR den Protospacer gegen einen gewünschten auszutauschen

und die modifizierte Kasette dann in pFC330 oder pFC332 einzubringen. Diese beiden Vektoren unterscheiden sich lediglich in der auf ihnen befindlichen Markerkasette (*pyrG* Auxotrophiekasette auf pFC330 und Hygromycin-B Resistenzkasette (*hph*) auf pFC332). Die Vektoren enthalten das *cas9*-Gen aus *S. pyogenes* unter Kontrolle des *tef1*-Promotors und Terminators aus *A. nidulans*. Das *cas9*-Gen ist für *Aspergillus niger* codonoptimiert und am C-Terminus mit dem SV40 Kernlokalisierungssignal (PKKKRKV) versehen. Desweiteren enthalten die Vektoren einen Replikationsursprung (*ori*) sowie eine Ampicillinresistenz (*ampR*) zur Replikation und Selektion in *E. coli*. Zusätzlich enthalten die Vektoren eine AMA1-Sequenz zur freien Replikation in Pilzen. Das verhindert die Integration ins Genom und ermöglicht ein Marker-Recycling, da das Plasmid und damit die Markerkasette bei ausbleibendem Selektionsdruck verloren geht. Das Konstrukt zur Expression der sgRNA auf pFC334 beinhaltet den *gpdA*-Promoter und *trpC*-Terminator aus *A. nidulans*. Die sgRNA wird von zwei Ribozymen flankiert: Am 5'-Ende befindet sich *Hammerhead* Ribozym und am 3'-Ende das Hepatitis-Delta-Virus Ribozym. Beide Ribozyme stabilisieren das sgRNA-Konstrukt und setzen es nach der Expression frei. Zum Austausch des Protospacers werden die Primer so gewählt, dass sie die neue Protospacer-Sequenz enthalten. Beim Binden überspannen sie den in pFC334 enthaltenen Protospacer, sodass die amplifizierten PCR-Fragmente den neuen Protospacer enthalten. Analog werden in einem separaten Fragment 6 Basen der *Hammerhead* Ribozymsequenz ausgetauscht, die komplementär zum Protospacer sind, sich mit diesem paaren und so die Abspaltung des Ribozyms gewährleisten (**Abb. 12**). Weiterhin werden die Primer so gestaltet, dass die entstehenden Fragmente jeweils 20 Nukleotide Überhänge haben, die komplementär zueinander und zum Insertionsloкус im Destinationsvektor sind. Nach der PCR können die beiden entstandenen Fragmente mittel *Gibson-assembly* in den mit PacI linearisierten Zielvektor kloniert werden (**Abb. 12**).

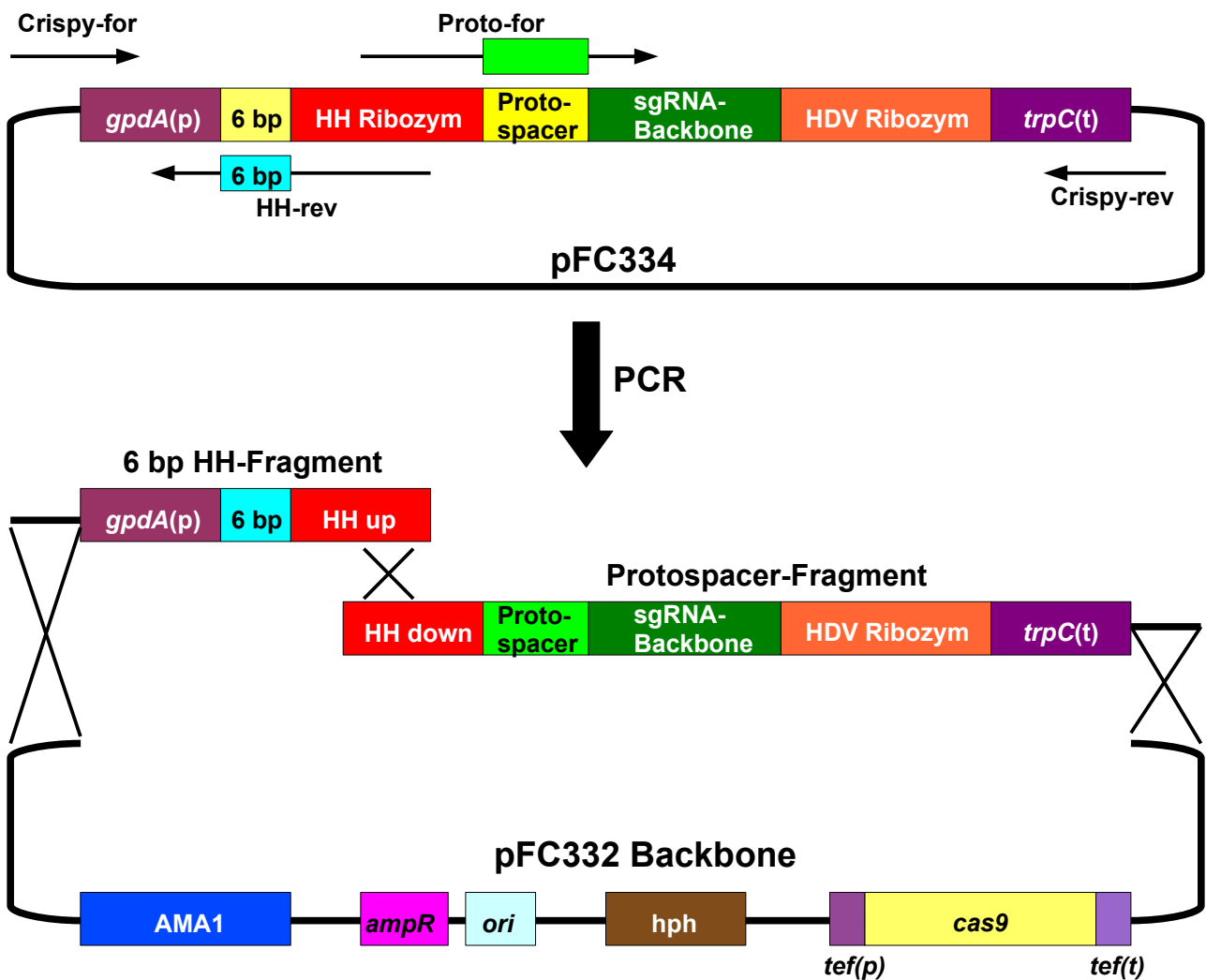


Abbildung 12: Konstruktion der CRISPR/Cas9 Vektoren zur Gen-Inaktivierung in *A. alternata*. Zur Generierung der beiden Fragmente wurde das Plasmid pFC334 als Template eingesetzt. Dieses enthält bereits einen Protospacer aus dem *yA*-Gen aus *A. nidulans*. Die Primer HH-rev und Proto-for enthalten an das Zielgen angepasste Bereiche, durch die der Protospacer sowie 6 Basen komplementär zum Protospacer ausgetauscht werden, indem sie diesen Bereich im Template-Vektor überspannen. Die entstandenen Fragmente sind in der HH Ribozym-Sequenz komplementär zueinander und an den anderen Enden komplementär zum Zielvektor (linearisiert mit *PacI*) und können mittels *Gibson-assembly* in diesen kloniert werden. (Modifiziert nach Nodvig *et al.*, (2015))

Um nun zu testen, ob dieses System ohne weitere Modifikationen in *A. alternata* anwendbar ist, wurden Gene als Ziel von Cas9 ausgewählt, die bei erfolgreicher Inaktivierung zu einem deutlichen Phänotyp führen. Die Wahl fiel auf zwei Gene, die an der Melaninbiosynthese beteiligt sind und deren Phänotyp nach Inaktivierung bereits beschrieben wurde: *pkcA* und *brm2* (Kimura & Tsuge, 1993). *PkcA* ist für die Synthese von 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalen, der erste Stoff im Melaninsyntheseweg, verantwortlich. *A. alternata* kann bei erfolgreicher Inaktivierung des Gens die entsprechende

Polyketidsynthese nicht mehr bilden, was in weißen Kolonien resultiert. *brm2* kodiert für die Trihydroxynaphtalenreduktase, ein Zwischenprodukt in der Melaninbiosynthese. Eine erfolgreiche Inaktivierung des Gens führt zu hellbraunen Kolonien. Für die Inaktivierung der beiden Gene wurden Protospacer gewählt, die sich zu Beginn des jeweiligen ORF befinden. Das sollte bezwecken, dass ein möglicherweise kritischer Teil des Gens nicht von einer möglichen Deletion bzw. der Verschiebung des Leserasters betroffen ist und teilweise seine Funktionalität beibehält. Der Protospacer für *pksA* bindet an der Position +32 bis +51 in 3'-Richtung des Startcodons, der für *brm2* an der Position +18 bis +37. Die Protospacer wurden wie oben beschrieben in den Vektor pFC332 kloniert und die so erhaltenen Vektoren pCP1 (*pksA*) und pMW29 (*brm2*) mittels Protoplastentransformation in den *A. alternata* Wildtypstamm ATCC 66981 eingebracht. Die transformierten Protoplasten wurden in handwarmes Regenerationsmedium eingegossen und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Zur Selektion wurde der Transformationsansatz anschließend mit hygromycinhaltigem Regenerationsmedium (80 µg/ml) überschichtet. Nach vier Tagen erschienen Kolonien auf den Transformationsplatten, von denen einige den erwarteten Phänotyp zeigten (**Abb. 13 A**). Kolonien der Transformationsplatten wurden auf frische Platten überimpft. Wurden Kolonien überimpft, die nicht den erwarteten Phänotyp zeigten, wuchsen auf den frischen Platten neue Kolonien, die teilweise wiederum nicht weiß beziehungsweise braun waren, jedoch wuchsen auch Kolonien, die nun den Phänotyp zeigten (**Abb. 13 B**). Das zeigt, dass beim Aufrechterhalten des Selektionsdrucks das CRISPR/Cas9-System weiterhin aktiv bleibt. Kolonien, die bereits den erwarteten Phänotyp zeigten und auf Medium ohne Selektionsmarker überimpft wurden, behielten den Phänotyp bei, was für eine stabile Inaktivierung des Gens spricht (**Abb. 13 C**). Wurden Mutanten für mehrere Generationen auf nicht-selektivem Medium kultiviert, konnten sie anschließend nicht mehr auf Selektionsmedium wachsen, was den Verlust des jeweiligen Plasmids zeigt.

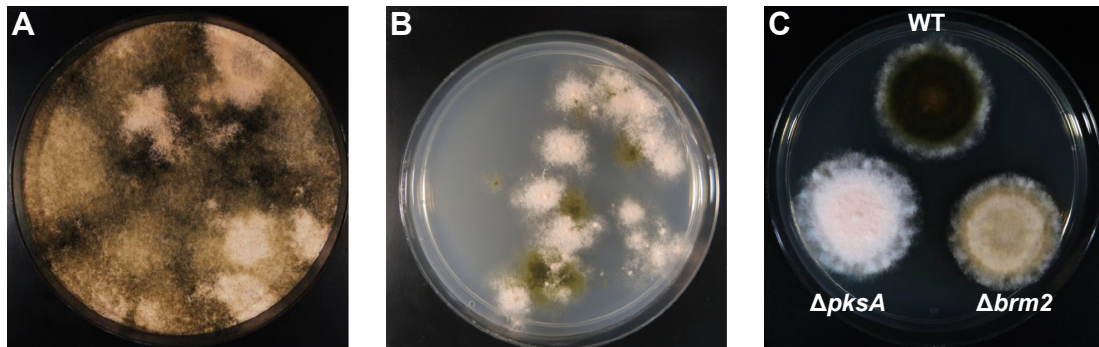


Abbildung 13: Inaktivierung von Genen des Melaninsynthesewegs in *A. alternata*. **A:** Nachdem Protoplasten mit dem Plasmid pCP1 zur Inaktivierung von *pksA* transformiert wurden, sind bereits auf der Transformationsplatte weiße Kolonien zu sehen, die den erwarteten Defekt in der Melaninbiosynthese aufweisen. **B:** Wurden Kolonien, die dem Wildtypphänotyp entsprachen auf hygromycinhaltigem Medium ausgestrichen, blieb das CRISPR/Cas9-System aktiv und weitere Mutanten kamen zum Vorschein. **C:** Stabile Melaninmutanten und Wildtyp im Vergleich. Der $\Delta pksA$ - und $\Delta brm2$ -Stamm sind nicht mehr in der Lage Melanin zu synthetisieren, weshalb sie weiß beziehungsweise braun erscheinen. (Wenderoth *et al.*, 2017)

Die Mutationen entstehen durch Fehler bei der Reparatur der von Cas9 eingeführten Doppelstrangbrüche mittels NHEJ. Da dabei auftretende Deletionen und Insertionen zufällig sind, wurden die Mutanten daraufhin untersucht. Hierzu wurde genomische DNA von Mutanten extrahiert und mit einer PCR ein 1 kb großes Fragment amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie 500 bp *upstream* und *downstream* der Protospacersequenz binden. Da in der *pksA*-Mutante kein entsprechendes Fragment amplifiziert werden konnte, wurde hier der zu amplifizierende Bereich auf 3 kb vergrößert. Auf diese Weise konnte ein etwa 1,5 kb großes Fragment amplifiziert werden. Die entsprechenden Fragmente der *pksA*- und *brm2*-Mutanten wurden sequenziert. Die Deletion der zufällig ausgewählten *pksA*-Mutante entsprach 1589 bp und reichte über das Startcodon hinaus in den Promotorbereich hinein. Bei *brm2*-Mutanten reichten die Deletionen von einem bis 303 Nukleotiden (**Abb. 14**). Die Generierung und Sequenzanalysen der *brm2*-Mutanten wurden von Maximilian Wenderoth im Rahmen der Publikation (Wenderoth *et al.*, 2017) und seiner Doktorarbeit (2018) durchgeführt.

Um dominante Marker wie Hygromycin zu vermeiden, können Auxotrophiemarker benutzt werden. Dabei dient als Selektionsmarker ein für den Organismus essentielles Gen, welches zuvor im Stamm inaktiviert wurde. Die Selektion anhand eines Auxotrophiemarker bietet gegenüber dominanten Markern in verschiedenen Experimenten einen Vorteil oder macht diese erst möglich. Da für *A. alternata* bislang keine auxotrophen Stämme existieren, konnte dies nun mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems bewerkstelligt

werden. Einer der gängigsten Auxotrophiemarker ist die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase. Das entsprechende Gen ist in Modellorganismen der Pilzforschung wie *S. cerevisiae* (*ura3*), *A. nidulans* (*pyrG*) und *N. crassa* (*pyr-4*) bereits seit langem ein etablierter Auxotrophiemarker. Nun sollte das Gen zur Synthese von Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase im *A. alternata* Wildtyp ATCC 66981 inaktiviert werden. Dafür wurde dieselbe Strategie wie zur Inaktivierung der Melaninsynthesegene angewandt.

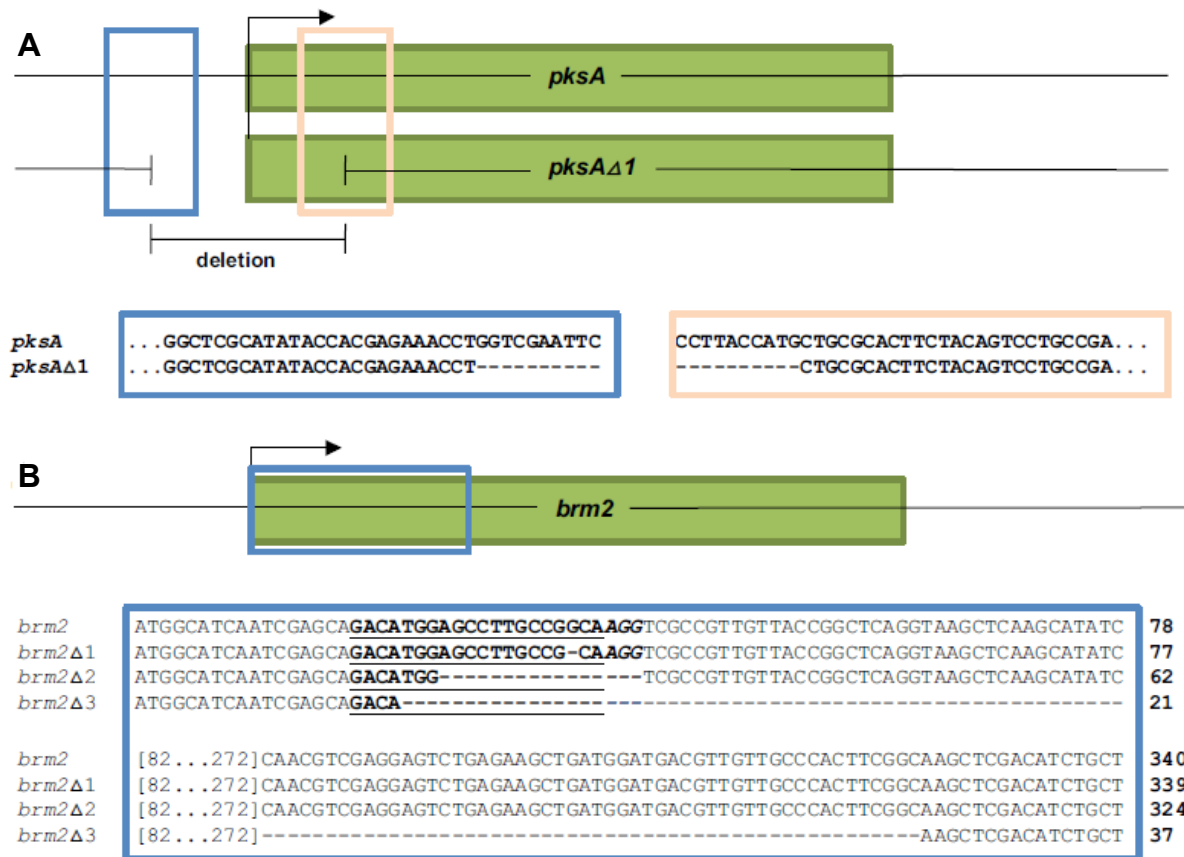


Abbildung 14): Untersuchung der Mutationen der inaktivierten Gene. A: Die Deletion des *pksA*-Gens umfasst etwa 1,5 kb und beinhaltet das Startcodon sowie einen Teil des entsprechenden Promotorbereichs. **B:** Vergleich auftretender Deletionen durch fehlerhaftes NHEJ in drei *brm2*-Mutanten. Die Sequenzierungen ergaben die Deletion von einem Nukleotid, 16 bp und 303 bp. (Wenderoth *et al.*, 2017)

Es wurde ein Protospacer ausgewählt, der sich an Position +138 im ORF befindet und mit welchem dann der Vektor pMW46 kloniert wurde. Die Selektion erfolgte über Hygromycin. Das Regenerationsmedium wurde mit Uracil und Uridin (je 1 g/l) ergänzt, sodass Transformanten mit inaktiviertem *pyrG* wachsen konnten. Von den primären Transformationsplatten wurden 24 Kolonien jeweils auf verschiedene Medien überimpft.

Einmal auf mCDB mit Hygromycin und Uracil/Uridin, einmal auf mCDB mit Hygromycin ohne Uracil/Uridin und einmal auf mCDB mit 5'-Fluororotsäure. Dieser Stoff wird von der Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase in das toxische 5'-Fluoruracil umgewandelt, sodass Kolonien mit intaktem *pyrG*-Gen hierauf nicht wachsen können. Von den 24 überimpften Transformanten waren 6 nicht mehr in der Lage auf Medium, das nicht mit Uracil und Uridin ergänzt war, zu wachsen. Auf ergänztem Medium zeigten sie normales Wachstum. Auf dem 5'-Fluororotsäurehaltigem Medium zeigten alle Transformanten stark eingeschränktes Wachstum, wovon die 6, welche ohne Uracil/Uridin nicht mehr wachsen konnten, jedoch größere Kolonien und Sporen bildeten. Diese Untersuchungen der Transformanten zeigen, dass ein paar von ihnen kein intaktes *pyrG*-Gen mehr hatten. Von den 6 positiven Transformanten wurde eine ausgewählt. Durch drei Passagen der Kultivierung auf Medium ohne Hygromycin verlor der Stamm seine Hygromycinresistenz und war nun nicht mehr in der Lage auf Medium mit Hygromycin und ohne Uracil/Uridin zu wachsen (**Abb. 15**).

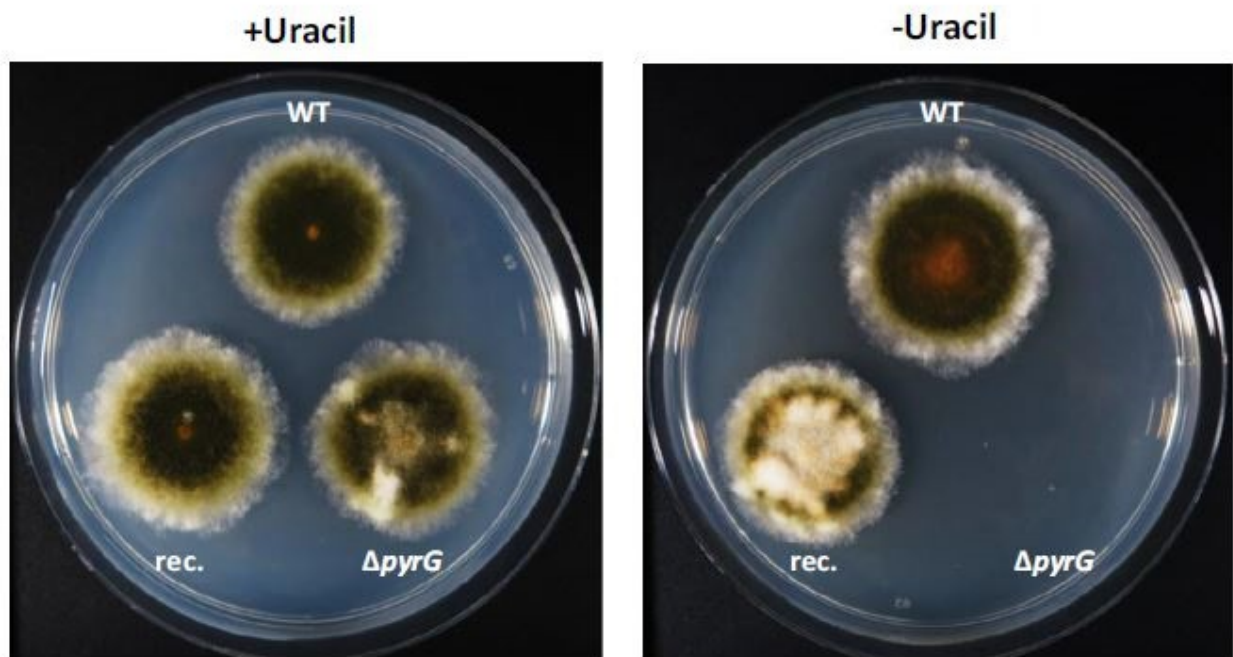


Abbildung 15: Generierung eines Uracil-auxotrophen Stammes und seine Rekplementation. Mittels des CRISPR/Cas9-Systems konnte ein *pyrG*-Deletionsstamm erstellt werden. Wird dem Medium Uracil beigefügt, bildet der Stamm eine Kolonie, die mit dem Wildtyp vergleichbar ist (links). Ist das Medium nicht mit Uracil ergänzt, kann der Stamm nicht wachsen, was seine Auxotrophie bestätigt (rechts). Durch Transformation mit einer Auxotrophie-Kassette, die das *pyr-4*-Gen aus *N. crassa* enthält, erlangt der Stamm seine Fähigkeit zurück, ohne zusätzlich zugegebenes Uracil zu wachsen.

Nun sollte getestet werden, ob etablierte Auxotrophie-Kassetten zur Selektion in diesem Stamm verwendet werden können. Der Vektor pFC330 trägt eine Auxotrophie-Kassette, die *pyrG* aus *A. fumigatus* enthält. Der für *A. nidulans* etablierte Efimov-Vektor trägt eine Kassette, die *pyr-4* aus *N. crassa* enthält. Beide Vektoren wurden mittels Protoplastentransformation in sMW24 eingebracht. Hier wurde direkt auf den primären Transformationsplatten selektiert, indem das Regenerationsmedium nicht mit Uracil und Uridin ergänzt wurde. Beide Vektoren konnten die Auxotrophie rekompimentieren und führten zu Wachstum von Transformanten auf selektivem Regenerationsmedium. Auf Transformationsplatten, die mit *pyrG* rekompimentiert wurden, waren nach etwa sieben Tagen erste Kolonien sichtbar. Auch hier war durch mehrere Passagen der Kultivierung auf nicht-selektivem Medium ein Marker-Recycling möglich, wodurch der Stamm seine Fähigkeit auf nicht mit Uracil/Uridin ergänztem Medium zu wachsen wieder verlor. Wurde die Protoplastentransformation mit dem Efimov-Vektor durchgeführt, waren bereits nach vier Tagen sporulierende Kolonien sichtbar. Da der Efimov-Vektor keine AMA1-Sequenz enthält, konnte die Auxotrophie-Kassette ektopisch ins Genom integrieren, was in einer stabilen Rekompimentation resultierte. Auch nach mehreren Generationen auf nicht-selektivem Medium behielt der Stamm seine Fähigkeit bei, auf Medium zu wachsen, das nicht mit Uracil/Uridin ergänzt war (**Abb. 15**).

3.2 Inaktivierung von *opsA* und *opsB* in *A. alternata*

Eine gängige Methode zur Untersuchung von Genen ist deren Inaktivierung und die anschließende Charakterisierung der Deletionsmutanten. Mit der Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in *A. alternata* konnte dies nun bewerkstelligt werden. Hierfür wurden, wie in 3.1 Protospacer für *opsA* und *opsB* gewählt, die sich zu Beginn des jeweiligen ORF befanden. Für *opsB* befand sich der Protospacer an Position +101 bis +120 im ORF mit dem PAM CGG. Um zu testen, ob mittels Cas9 auch definierte Deletionen durchgeführt werden können, wurden für *opsA* zwei Protospacer im Abstand von 125 bp ausgewählt, der erste an Position +9 bis +28 mit dem PAM CGG und der zweite an Position +134 bis +153 mit dem PAM TGG. Die Fragmente für die sgRNA-Kassette, die den Protospacer für *opsB* enthielt, wurden mittels *Gibson-assembly* in den Vektor pFC330 kloniert. Da zur Inaktivierung von *opsA* zwei unterschiedliche sgRNA-Kassetten amplifiziert wurden, wurde eine in pFC330 (*pyrG*) und eine in pFC332 (*hph*) kloniert. Die so entstandenen Vektoren pCP2 (*opsA*-Protospacer1 mit *pyrG*-Auxotrophiekassette), pCP3 (*opsA*-Protospacer2 mit *hph*-Resistenzkassette) und pCP4 (*opsB*-Protospacer mit *pyrG*-Auxotrophiekassette) wurden mittels Protoplastentransformation in sMW24 eingebracht. Dabei wurden pCP2 und pCP3 zusammen in einer Co-Transformation zu gleichen Teilen in den Transformationsansatz gegeben. Die Selektion nach Transformanten, welche die Vektoren erfolgreich aufgenommen hatten, erfolgte dadurch, dass die Protoplasten in Regenerationsmedium eingegossen wurden, das nicht zusätzlich mit Uracil/Uridin ergänzt wurde. Im Falle der Co-Transformation mit pCP2 und pCP3 wurden die Transformationsplatten zusätzlich, nach einer Regenerationsphase über Nacht mit hygromycinhaltigem Regenerationsmedium (80 µg/ml) überschichtet, um zu gewährleisten, dass beide Vektoren aufgenommen wurden. Weiterhin wurden Kolonien, die auf den primären Transformationsplatten wuchsen auf selektives Medium übertragen. Da kein bestimmter Phänotyp erwartet werden konnte, erfolgte die Suche nach Transformanten, bei denen eine Mutation im jeweiligen ORF entstanden war, anhand von PCRs. Dafür wurde von selektierten Kolonien genomische DNA extrahiert und ein Bereich um die Protospacersequenz im ORF amplifiziert. Für potentielle Mutationen im ORF von *opsB* wurden die Primer so gewählt, dass ein 1 kb Fragment amplifiziert wird, in dessen Mitte der Protospacer liegt. Da nach der Co-Transformation mit pCP2 und pCP3 nach einer definierten Deletion von 125 bp gesucht wurde und diese auf einem Agarosegel sichtbar sein sollte, wurden hier die Primer so gewählt, dass sie ein 500 bp Fragment amplifizieren. Auf diese Weise konnte von den

Kolonien, die mit pCP2 und pCP3 transformiert wurden, eine Transformante identifiziert werden, dessen amplifiziertes Fragment in seiner Größe vom Wildtyp abwich (**Abb. 17 C**). Das Fragment, das aus der genomischen DNA des Transformanten amplifiziert wurde, war auf dem Gel etwa 100 bp kürzer, als das exakt 500 bp lange Fragment, das aus genomischer DNA des Wildtyps amplifiziert wurde. Auch von den Transformanten, in die pCP4 eingebracht wurde, konnte eine identifiziert werden, deren amplifiziertes Fragment sich in der Länge vom Wildtyp-Fragment unterschied. Dieses Fragment war etwa 500 bp länger, als das des Wildtyps. Die Fragmente der potentiellen Mutanten wurden aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass exakt die 125 bp zwischen den beiden Schnittstellen der Protospacer von Cas9 im ORF von *opsA* deletiert waren (**Abb. 16 A**) und es somit möglich ist, mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems definierte Deletionen durchzuführen. Die 125 bp Deletion resultierte in einer Verschiebung des Leserasters, wodurch sich die Aminosäuresequenz änderte (**Abb. 16 B**). Dadurch entstand ein frühzeitiges Stopcodon das zu einem Abbruch der Translation nach 72 Aminosäuren des normalerweise 309 Aminosäuren langen Proteins führt. Durch diese Deletion sollte das Gen seine Funktionalität verloren haben. Für die potentielle *opsB*-Mutante ergab die Sequenzierung, dass in der Schnittstelle des Protospacers eine Insertion von 599 bp stattgefunden hatte (**Abb. 16 A**). Bei dieser Insertion handelte es sich um ein Fragment der *pyrG*-Auxotrophiekassette. Durch die Insertion entstand auch im *opsB*-Gen eine Verschiebung im Leseraster (**Abb. 16 B**), die zu einem frühzeitigen Stopcodon in *opsB* kurz nach der Insertion führte. Das inserierte *pyrG*-Fragment war nicht in seinem natürlichen Leseraster, wodurch auch hier zwei unnatürliche Stopcodons auftraten. Somit ist anzunehmen, dass sowohl das mutierte *opsB*-Gen als auch das *pyrG*-Fragment nicht funktionsfähig sind. Auch nach mehrmaligem überimpfen auf nicht-selektives Medium waren die Mutationen stabil und konnten mittels PCR nachgewiesen werden (**Abb. 16 C**). Die so generierten Stämme wurden sCP2 ($\Delta opsA$) und sCP3 ($\Delta opsB$) genannt. Zur Identifikation des $\Delta opsA$ -Stamms wurden 24 Transformanten nach der Selektion untersucht von denen drei die definierte Deletion zeigten. Zur Identifikation des $\Delta opsB$ -Stamms insgesamt 60 Transformanten untersucht, von denen nur zwei eine Mutation aufwiesen. Eine davon war eine 33 bp Deletion, die nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führte.

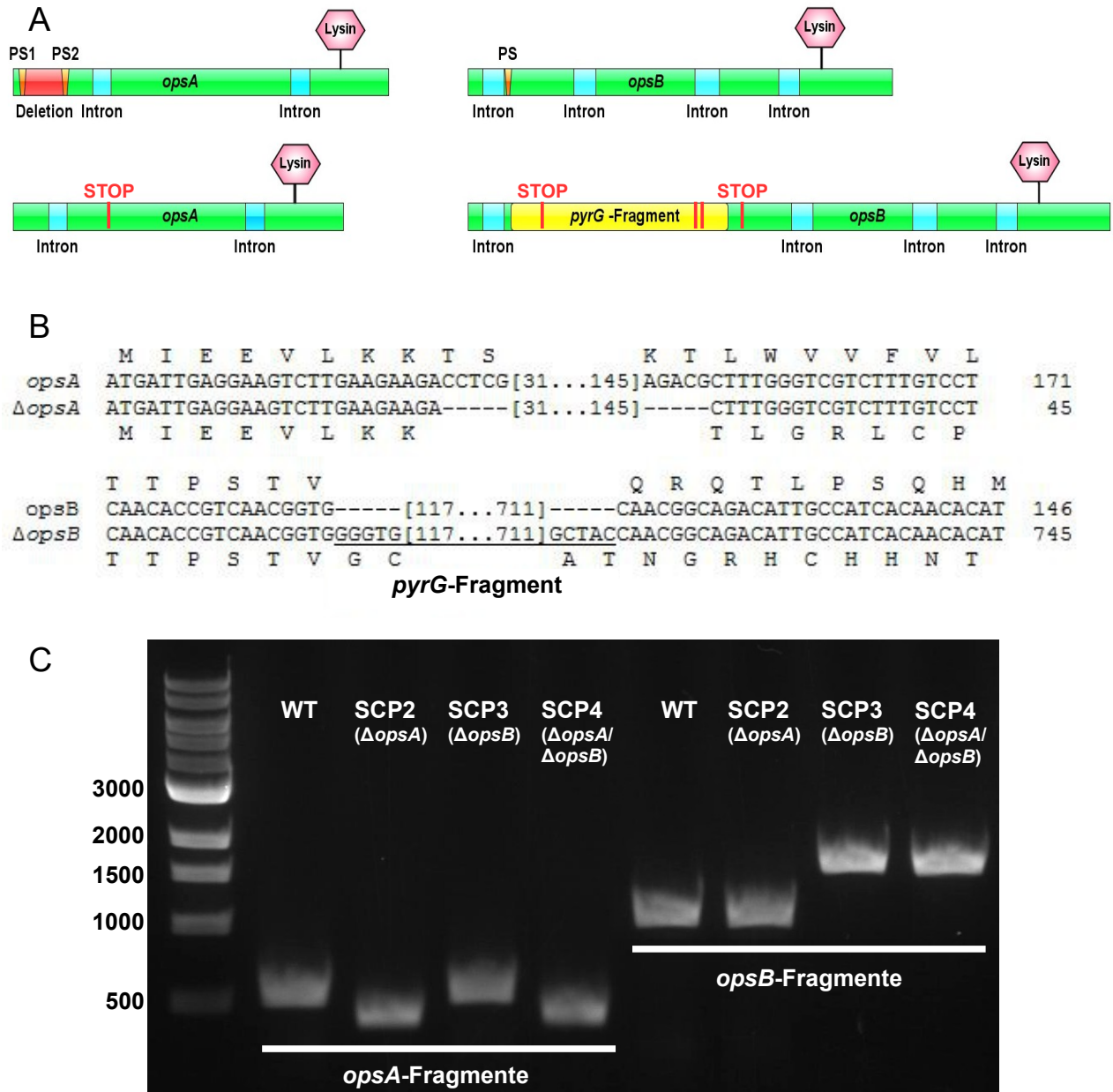


Abbildung 16: Inaktivierung der Gene *opsA* und *opsB* mittels CRISPR/Cas9. **A:** Durch Co-Transformation mit pCP2 und pCP3 wurden zwei unterschiedliche Schnittstellen für Cas9 im *opsA*-ORF gesetzt. Durch die eingeführten Doppelstrangbrüche konnte der definierte Bereich zwischen den Schnittstellen deletiert werden. Für *opsB* wurde ein Protospacer gewählt, in dessen Schnittstelle ein Teil der *pyrG*-Auxotrophiekassette inserierte. **B:** Beide Mutationen führten zu einer Verschiebung im Leseraster, wodurch frühzeitige Stopcodons entstanden. **C:** Die Suche nach potentiellen Deletionsstämmen erfolgte auf Agarosegelen anhand von PCRs. Die Deletion im *opsA*-ORF und Insertion im *opsB*-ORF blieben auch nach Kultivierung auf nicht-selektivem Medium stabil und konnten weiterhin auf einem Agarosegel nachgewiesen werden.

3.3. Die Inaktivierung von *opsA* und *opsB* war erfolgreich und sie regulieren sich gegenseitig

Opsine sind potentielle Photorezeptoren und somit Sensorproteine. In der Regel nehmen sie einen äußeren Reiz wahr und leiten das Signal in den Zellkern weiter, wo die Zelle durch eine Änderung der Expression verschiedener Gene auf das Signal reagiert. Wird unter verschiedenen definierten Bedingungen eine Änderung der Expression von Genen gemessen, deren Funktion bekannt ist, so können Rückschlüsse darüber gezogen werden, wie, beziehungsweise auf welche Weise der Organismus auf diese Bedingungen oder Reize reagiert. Solche definierten Bedingungen kann auch die Deletion eines Gens sein. Die Analyse der Expression von Genen erfolgt in der Regel mittels quantitativer *Real-time* PCR (qRT-PCR). Mit dieser Methode sollten auch die potentiellen Opsin-Deletionsstämme untersucht werden, um einerseits die erfolgreiche Inaktivierung der Gene zu bestätigen und andererseits Funktionen der Opsine durch die Messung verschiedener Gene, deren Funktion bekannt ist, offenzulegen. Hierfür wurden Sporen des Wildtyps und der Deletions-Stämme in flüssigem mCDB bei 28 °C und in völliger Dunkelheit inkubiert. Nach 36 Stunden wurde aus dem gewachsenen Myzel RNA mithilfe des OMEGA Fungal-RNA Kits isoliert. Von jedem Stamm sowie vom Wildtyp wurden Proben zuvor für 30 Minuten mit grünem Licht der Wellenlänge 525 nm und einer Intensität von 250 $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bestrahlt. Der zweite Ansatz wurde fast in kompletter Dunkelheit präpariert. Da dies nicht ohne weiteres möglich ist, wurde eine Dunkelrot-Lampe am anderen Ende des Raums platziert. Von der RNA wurden jeweils 100 ng für eine qRT-PCR verwendet. Als Referenzgen wurde das für Histon-2B kodierende Gen gewählt, da dies in *A. alternata* über längere Inkubationsdauer hinweg und unter verschiedensten Bedingungen eine stabile Expression aufweist. Alle qRT-PCR Versuche wurden im biologischen Triplikate und technischen Duplikate durchgeführt.

Die qRT-PCR zeigte, dass der Stamm sCP2 das Gen *opsA* nicht exprimiert. Im Stamm sCP3 konnte keine Expression von *opsB* gemessen werden. Im Stamm sCP4 wurden beide Gene nicht exprimiert (**Abb. 17**). Somit war die Inaktivierung der Opsine in den jeweiligen Stämmen erfolgreich. Im Wildtyp wurde die Expression von *opsA* nach Bestrahlung mit Grünlicht auf das 2,4-fache hochreguliert. Im *opsB*-defekten Stamm sCP3 der nicht mit Licht bestrahlt wurde konnte eine etwa 4,2-fach höhere Expression von *opsA* gemessen werden, verglichen mit dem Wildtyp unter gleicher Bedingung. Nach Bestrahlung mit Grünlicht entsprach die relative Expression von *opsA* etwa dem

Expressionsniveau von der Dunkelprobe von sCP3. Das spricht dafür, dass OpsB die Expression von *opsA* negativ reguliert und diese Regulation lichtunabhängig ist. Die Expression von *opsB* konnte im Wildtyp nicht durch Bestrahlung mit Grünlicht induziert werden. Ohne Bestrahlung zeigte der OpsA-defekte Stamm sCP2 eine 4,5-fach erhöhte Expression von *opsB*. Durch Bestrahlung konnte in diesem Stamm die Expression von *opsB* auf etwa die Hälfte reduziert werden, entspricht damit jedoch noch einer doppelt so hohen relativen Expression verglichen mit dem Wildtyp. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass OpsA und OpsB das entsprechende Gen des anderen Proteins negativ regulieren und dass dieser Effekt im *opsB*-defekten Stamm unabhängig von Grünlicht ist. Die Expressionsanalyse zeigte ebenfalls, dass die Expression von *opsB* im Allgemeinen 5 bis 10 mal höher ist als die von *opsA*. Da in vielen filamentösen Pilzen eine Verbindung zwischen Lichtwahrnehmung und der Stressantwort besteht, wurde die Expression eines Katalase-Gens (*catA*) und eines Superoxid Dismutase-Gens (*sodB*) gemessen. Für die Katalase zeigte sich, dass die Expression des Gens *catA* durch Grünlicht auf das 2,5-fache hochreguliert wird. In sCP2 wurde die Expression von *catA* etwa verdoppelt, da die Expression schon in Dunkelheit leicht erhöht war. In sCP3 war die Expression von *catA* in Dunkelheit ebenfalls leicht erhöht. Durch die Bestrahlung mit Grünlicht wurde die Expression jedoch stärker erhöht als im Wildtyp auf das 3,2-fache. Die erhöhte Expression von *catA* in Dunkelheit konnte auch in sCP4 gemessen werden und die Erhöhung der Expression durch Grünlicht war mit einer Steigerung auf das 4,4-fache am stärksten. Die Expression des Superoxid Dismutase-Gens *sodB* wurde im Wildtyp durch die Bestrahlung mit Grünlicht ebenfalls auf fast das Doppelte erhöht, wohingegen in sCP2 die Induktion der Expression durch Grünlicht nicht mehr vorhanden war. In sCP3 war die Expression in Dunkelheit im Vergleich zum Wildtyp bereits fast um 50 % erhöht und durch Bestrahlung mit Grünlicht wurde etwa das Expressionsniveau des Wildtyps erreicht. Die Expression von *sodB* in Dunkelheit war in sCP4 noch weiter gestiegen und erreichte das gleiche Niveau, wie durch Bestrahlung mit Grünlicht im Wildtyp und sCP3.

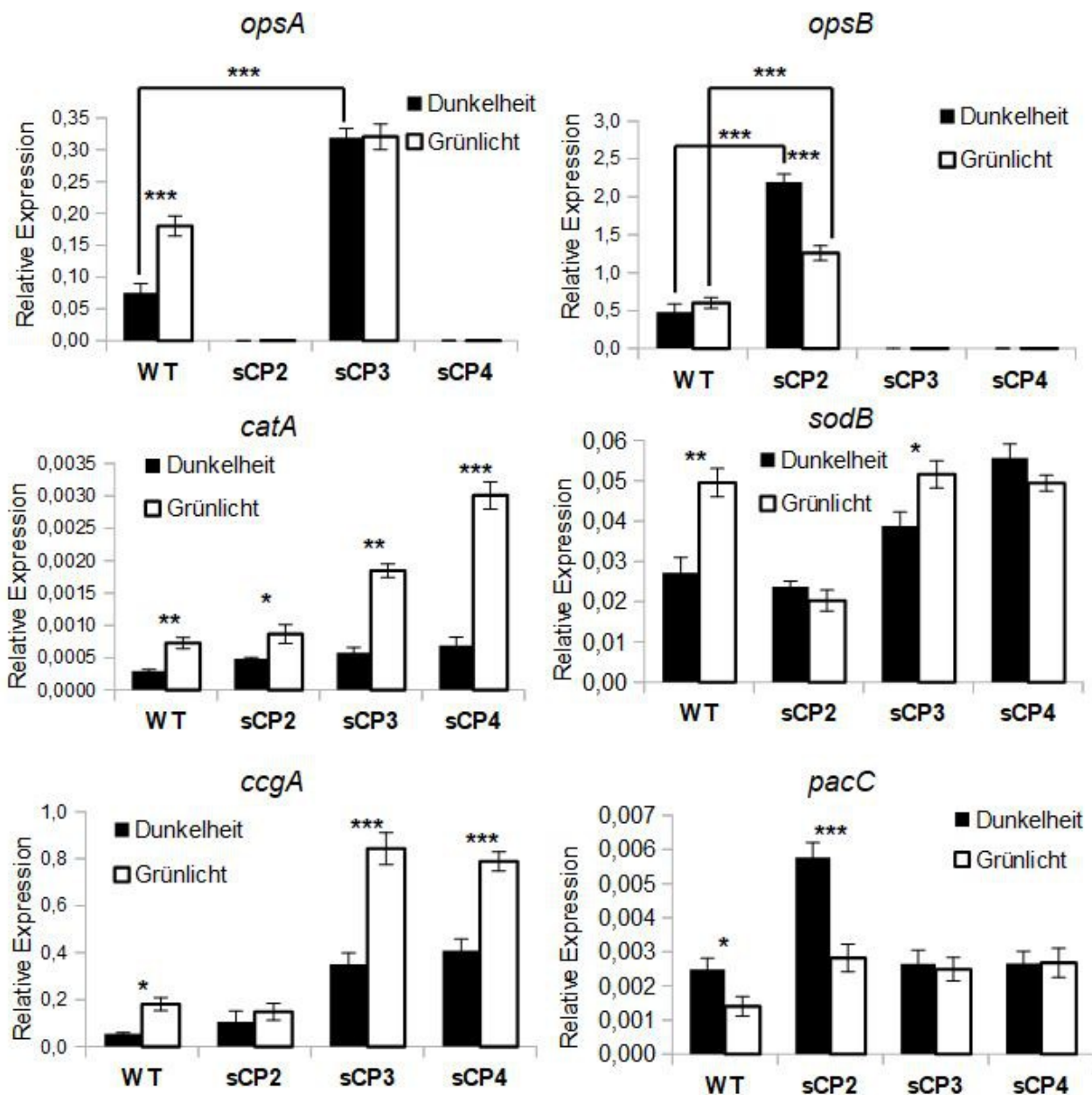


Abbildung 17: Expressionsanalyse verschiedener Gene im Wildtyp und den Inaktivierungsstämmen sCP2 ($\Delta opsA$), sCP3 ($\Delta opsB$) und sCP4 ($\Delta opsA/\Delta opsB$). Die Stämme, die mittels CRISPR/Cas9 genetisch manipuliert wurden, zeigen keine Expression der entsprechenden Gene. Das Myzel wurde entweder in fast völliger Dunkelheit in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder zuvor für 30 min mit Grünlicht bestrahlt. Das angegebene Expressionsniveau ist relativ zum Haushaltsgen H2B. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Analyse erfolgte mittels *Student's t-test*, *** = $P \leq 0,001$.

Weiterhin wurde die Expression der Gene *ccgA* und *pacC* untersucht. Die Expression von *ccgA* ist in vielen filamentösen Pilzen stark von Licht reguliert und wurde deshalb in verschiedenen Studien als Reporter für eine Lichtantwort von Weiß-, Rot- und Blaulicht benutzt (Ruger-Herreros *et al.*, 2011; Hedtke *et al.*, 2015; Igbalajobi *et al.*, 2019). Es zeigte sich, dass Grünlicht ebenfalls in der Lage war, die Expression von *ccgA* im Wildtyp zu erhöhen (3,3-fach). Die Grünlichtabhängige Induktion ging in sCP2 verloren. In sCP3 und sCP4 war die Expression in Dunkelheit etwa auf das 7-fache erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Die Bestrahlung mit Grünlicht führte zu einer weiteren Erhöhung der Expression auf das 3,3-fache und stellt damit dasselbe Verhältnis zwischen Expression in Dunkelheit und nach Bestrahlung mit Grünlicht dar, wie es im Wildtyp beobachtet wurde. Das Gen *pacC* kodiert für ein Protein, das eine zentrale Rolle in der pH-Regulation spielt. Da es sich bei den Opsinen um Protonenpumpen handelt, wurde dieses Gen ebenfalls untersucht. Hier zeigte sich, dass das Gen im Wildtyp sowie sCP3 und sCP4 in Dunkelheit auf gleichem Niveau exprimiert wird. Im Wildtyp führte die Bestrahlung mit Grünlicht zu einer leichten Repression. Das war für sCP3 und sCP4 nicht der Fall. Ohne Bestrahlung mit Licht war die Expression in sCP2 im Vergleich zum Wildtyp auf das 2,3-fache erhöht und durch Bestrahlung mit Grünlicht wurde etwa das Expressionsniveau des Wildtyps in Dunkelheit sowie sCP3 und sCP4 (unabhängig von Bestrahlung) erreicht.

3.4 Morphologische Charakterisierung der Opsin-defekten Stämme

Die direkteste Methode ein Gen zu untersuchen ist die morphologische Charakterisierung des entsprechenden Deletionsstamms. Zunächst sollte die Morphologie des Kolonienwachstums der Mutanten mit dem Wildtyp verglichen werden. Hierzu wurden sie mit dem Wildtyp zusammen auf einer mCDB Agarplatte punktinokuliert und bei 28 °C inkubiert. Nach sechs Tagen war der Wildtyp zu einer großen, sporulierenden Kolonie gewachsen. sCP3 und sCP4 zeigten jeweils eine vergleichbare Koloniemorphologie. sCP2 hingegen war in seinem Koloniewachstum stark eingeschränkt (**Abb. 18 A**). Interessanterweise weist der Deletionsstamm beider Opsine nicht den Phänotyp von sCP2 auf. Eine zulässige Erklärung hierfür ist, dass OpsA und OpsB in dieser Hinsicht antagonistisch operieren und der Phänotyp von sCP2 rezessiv ist. Um zu bestätigen, dass das reduzierte Kolonienwachstum ein Phänotyp der *opsA*-Deletion war, wurde sCP2 mit dem Vektor pCP7, der eine intakte Kopie des *opsA*-Gens aus dem Wildtyp trägt, transformiert. Der daraus resultierende Stamm sCP5 war annähernd in der Lage eine mit

dem Wildtyp vergleichbare Kolonie zu bilden. Die leichte Abweichung im Erscheinungsbild könnte daher rühren, dass die intakte Kopie des Gens nicht im eigentlichen Locus, sondern ektopisch ins Genom integrierte. Um das Kolonienwachstum genauer zu untersuchen wurden die Kolonien vermessen (**Abb. 18 B**). Es wurden jeweils 3 Kolonien pro Stamm vermessen und die Werte gemittelt. Der Koloniedurchmesser des Wildtyps maß 2,65 cm. Die Kolonie von sCP3 war mit 2,9 cm minimal größer. sCP4 bildete mit 2,85 cm etwa gleich große Kolonien. Die sCP2 Kolonien waren mit 0,55 cm deutlich kleiner. Die kleinen Unterschiede der Koloniegößen der *opsB*-Mutanten zu dem Wildtyp ist auf dem repräsentativen Bild (**Abb. 18 A**) aufgrund der unterschiedlichen Melanisierung schwer zu erkennen.

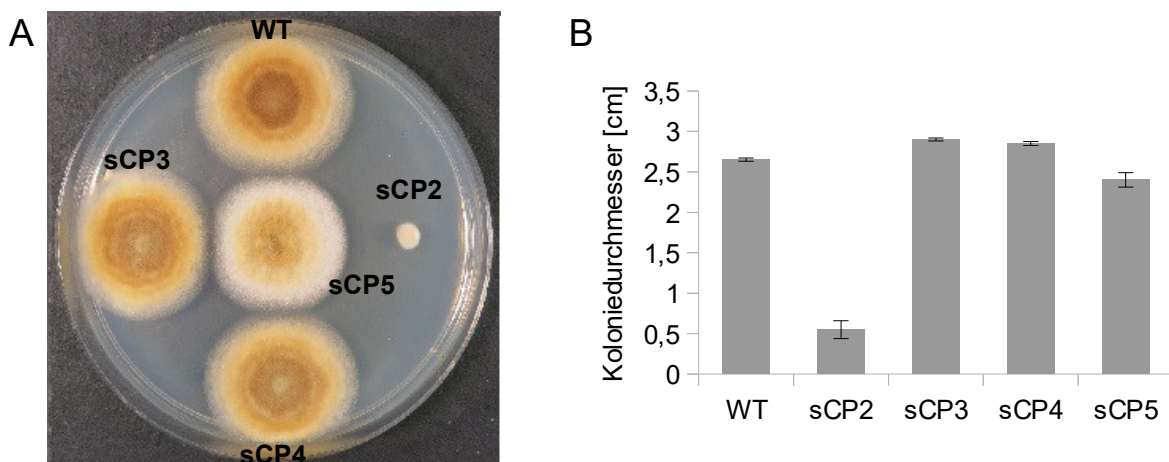


Abbildung 18: Koloniemorphologie der Opsin-Deletionsstämmen: Zum Vergleich der Kolonien wurden die Stämme sCP2 ($\Delta opsA$), sCP3 ($\Delta opsB$) und sCP4 ($\Delta opsA/\Delta opsB$) und der Wildtyp auf einer Platte zusammen inkubiert (**A**). Durch die Inaktivierung von *opsA* weist sCP2 ein stark eingeschränktes Kolonienwachstum auf. Durch Rekplementation mit dem intakten *opsA*-Gen aus dem Wildtyp (sCP5) konnte ein annähernd normales Wachstum wiederhergestellt werden. Die Inaktivierung von *opsB* führt zu keinem offensichtlichen Phänotyp. Interessanterweise gleicht die Inaktivierung beider Opsine der Inaktivierung von *opsB*. Durch Vermessung der Kolonien (**B**) zeigte sich, dass sCP3 und sCP4 minimal größere Kolonien bilden als der Wildtyp. Die Vermessung des Koloniedurchmessers wurde im Triplikate durchgeführt.

3.4.1 Die Inaktivierung der Opsine wirkt sich negativ auf die Sporenproduktion aus

Licht beeinflusst häufig die Sporenbildung von filamentösen Pilzen (Yu & Fischer, 2019). Das ist auch bei *A. alternata* der Fall (Pruß *et al.*, 2014). Da schon auf Kolonieebene eine leichte Veränderung der Färbung in den Opsin-defekten Stämmen erkennbar war, sollte untersucht werden, ob das unter anderem an einer Veränderung der Sporenbildung liegt. Hierfür wurden Sporensuspensionen des Wildtyps und der generierten Stämme erstellt und mithilfe eines Drigalskispatels jeweils 5.000 Sporen gleichmäßig auf Agarplatten verteilt. Die Platten wurden bei 28 °C in verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Anschließend wurden sämtliche Sporen mit einem Drigalskispatel in einer definierten Menge Wasser aufgenommen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Zusätzlich wurden vorher repräsentative Fotos der Platten aufgenommen (**Abb. 19**). Schon auf den Platten war zu erkennen, dass der Wildtyp in Dunkelheit und unter Rotlichtbestrahlung die meisten Sporen produzierte. Nach Zählung der Gesamtsporenzahl ergaben sich 354.000 Sporen in Dunkelheit und 563.000 Sporen bei der Kultivierung in Rotlicht, was einem Faktor von 1,6 entspricht. Beim Wachstum in Grün- und Blaulicht wurden deutlich weniger Sporen produziert. Unter Grünlicht produzierte der Wildtyp nur 182.000 Sporen und unter Blaulicht wurde mit 31.000 Sporen der geringste Wert ermittelt, der nur etwa 5 % der Rotlichtkultur darstellt. Bei der Sporenproduktion von sCP2 war nach Wachstum in Dunkelheit kein signifikanter Unterschied zu erkennen. sCP3 produzierte mit durchschnittlich 245.000 Sporen in Dunkelheit zwar etwas weniger als der Wildtyp, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. sCP4 produzierte unter dieser Bedingung nur noch knapp ein Viertel der Wildtypsporenzahl und weist somit eine deutlich reduzierte Sporenproduktion auf. Hier fand also eine lichtunabhängige Reduktion der Sporenbildung statt. Die im Wildtyp beobachtete rotlichtabhängige Induktion der Sporenbildung traf nicht auf die Opsin-defekten Stämme zu, was eine Interaktion mit dem in anderen Pilzen relativ gut erforschten Lichtsignalnetzwerk nahelegt. Im Wildtyp und sCP2 war Grünlicht in der Lage, die Sporenproduktion auf etwa 50 % (~160.000 Sporen), verglichen mit Wachstum in Dunkelheit, zu reduzieren. Die beiden Stämme, die kein funktionales *opsB* mehr besaßen, produzierten während der Bestrahlung mit Grünlicht mit ~25.000 deutlich weniger Sporen. Unter Blaulichtbestrahlung produzierten alle Stämme fast keine Sporen mehr und lieferte Werte, die mit der Sporenproduktion von sCP3 und sCP4 während Grünlichtbestrahlung vergleichbar sind.

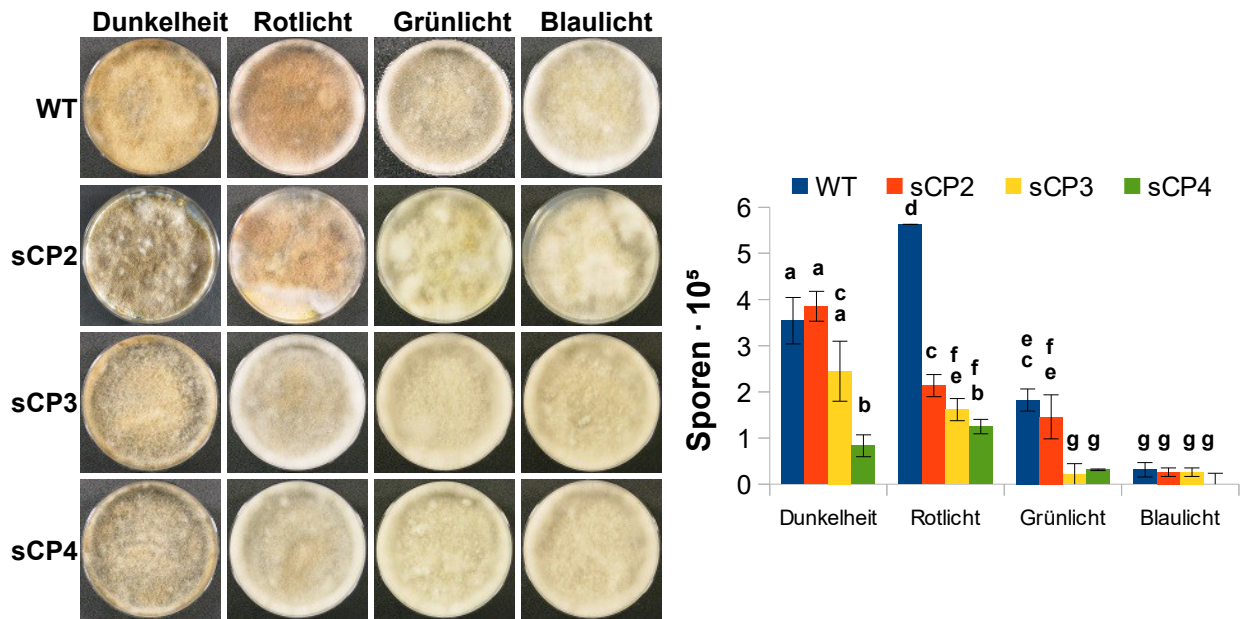


Abbildung 19: Untersuchung der Rolle von Opsinen bei der Sporenproduktion. Jeweils 5.000 Sporen des Wildtyps und der Opsin-defekten Stämme (sCP2: $\Delta opsA$; sCP3: $\Delta opsB$; sCP4: $\Delta opsA/\Delta opsB$) wurden gleichmäßig auf mCDB-Agarplatten verteilt und unter verschiedenen Lichtbedingungen bei 28 °C inkubiert. Nach 10 Tagen wurden Fotos der Platten geschossen (links), sämtliche Sporen in Wasser gelöst, abgenommen und ausgezählt (rechts). Im Allgemeinen produzierten die generierten Stämme unter verschiedenen Lichtbedingungen in unterschiedlichem Maße weniger Sporen als der Wildtyp, mit Ausnahme von Bestrahlung mit Blaulicht. Diese führte in allen Stämmen und dem Wildtyp dazu, dass fast keine Sporen mehr gebildet wurden. Die Bestrahlung mit Rotlicht führte als einzige Lichtfarbe und nur im Wildtyp zu einer Induktion der Sporenbildung. Die Platten wurden mit LED-Panelen mit Wellenlängenmaxima von 450 nm (blau), 525 nm (grün) und 700 nm (rot) bestrahlt. Jeder Ansatz wurde im Triplikate durchgeführt, die vergleichbare Erscheinungsbilder und Werte lieferten. Von den Platten ist jeweils eine repräsentative Platte als Bild gezeigt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Für die statistische Analyse wurde der Conover Test ohne anschließende p-Wert Korrektur durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an.

3.5 Grünlicht führt zu einer OpsB-abhängigen Phosphorylierung von HogA

Die MAP Kinase-Kaskade reguliert eine Vielzahl von Prozessen. In *A. nidulans* wird die Phosphorylierung und damit Aktivierung von HogA durch Licht stimuliert (Yu *et al.*, 2016). Nachdem HogA phosphoryliert wurde, wird es in den Zellkern transportiert, um dort das Signal weiterzugeben und die Expression verschiedener Gene zu regulieren. In *A. alternata* konnte gezeigt werden, dass Rotlicht und Blaulicht die Aktivierung von HogA induzierten (Igbalajobi *et al.*, 2019). Nun sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Opsinen und dem HOG Signalweg besteht und Grünlicht ebenfalls zu einer Phosphorylierung der MAP Kinase HogA führt. Hierfür wurden Sporen des Wildtyps sowie sCP2, sCP3 und sCP4 auf einem Deckgläschen in Dunkelheit inkubiert und nach 12 Stunden für 5 Minuten mit Grünlicht bestrahlt oder in vollständiger Dunkelheit fixiert.

Anschließend wurden die Proben für eine Immunfluoreszenzfärbung mittels Phospho-p38 MAPK Antikörper präpariert (**Abb. 20**). Wurden die Proben in völliger Dunkelheit fixiert, konnte eine schwache Fluoreszenz im Zytoplasma, jedoch keine Akkumulation des Signals im Zellkern, festgestellt werden. Nach Grünlichtbestrahlung des Wildtyps wurde das Signal stärker und häufte sich in den Zellkernen. Die Phosphorylierung und Lokalisierung von HogA nach Grünlichtbestrahlung konnte ebenfalls in sCP2 beobachtet werden, allerdings war die Akkumulation im Zellkern weniger stark ausgeprägt wie im Wildtyp nach Bestrahlung mit Grünlicht. In den OpsB-defekten Stämmen sCP3 und sCP4 konnte keine grünlichtabhängige Phosphorylierung von HogA verzeichnet werden. Zur Bestätigung der Kernlokalisierung wurden die Zellkerne mit Dapi gefärbt.

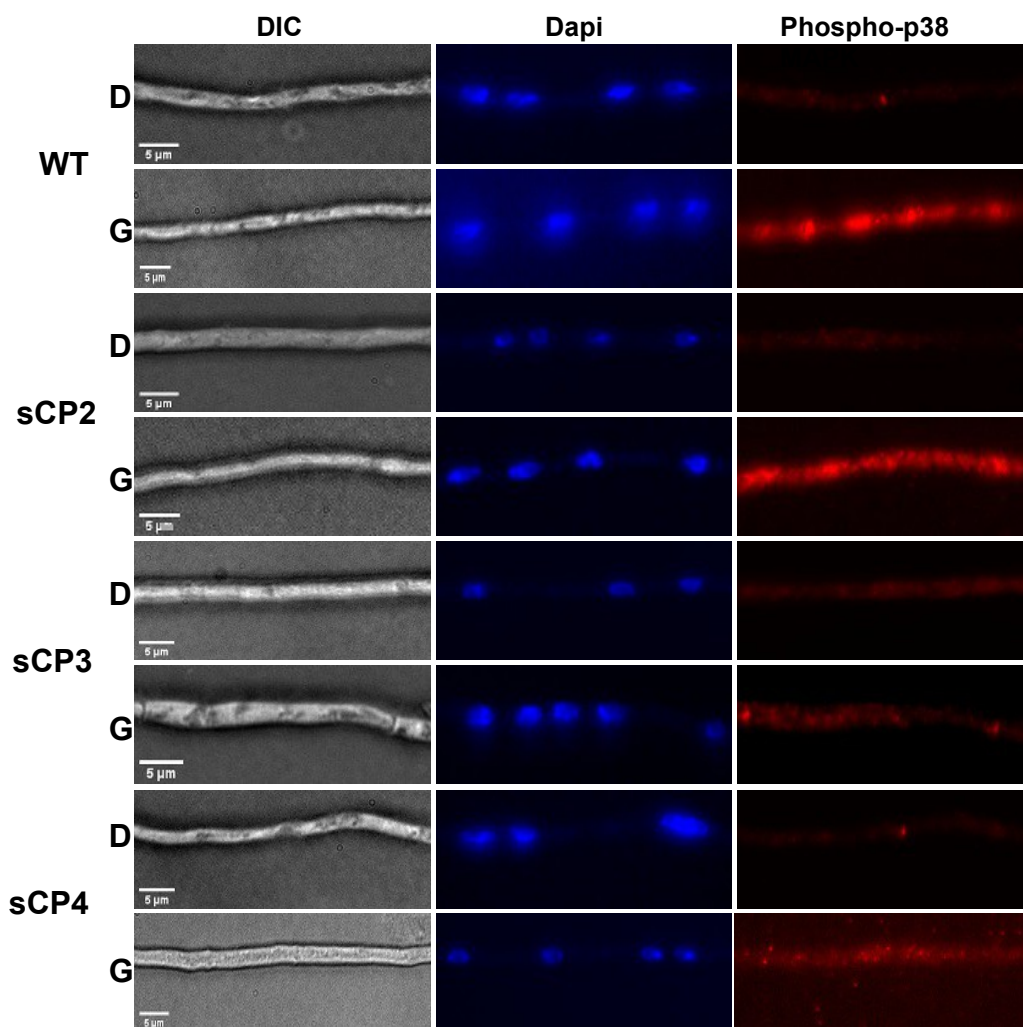


Abbildung 20: Phosphorylierung und Zellkerntransport von HogA durch Bestrahlung mit Grünlicht. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen der Hyphen vom WT und Stämmen mit inaktivierten Opsinen. Sporen der jeweiligen Stämme wurden für 12 h in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert und entweder in Dunkelheit fixiert (D) oder für 5 min mit Grünlicht bestrahlt (G). Der Phospho-p38 MAPK Antikörper bindet an die phosphorylierten Phosphorylierungsstellen von HogA und zeigt seine Aktivierung. Zur Bestätigung der Kernlokalisierung wurden diese mit Dapi gefärbt. (sCP2: $\Delta opsA$; sCP3: $\Delta opsB$; sCP4: $\Delta opsA/\Delta opsB$).

3.6 Lokalisierung von OpsA und OpsB in *A. alternata*

Die Lokalisierung von Proteinen im Organismus liefert häufig Hinweise auf ihre Funktion. Zwar ist bekannt, dass Opsine durch ihre sieben Transmembrandomänen in Membranen lokalisieren, jedoch gibt es viele verschiedenen Membranen in einer Zelle. Da nun ein auxotropher Stamm von *A. alternata* vorhanden war, sollten OpsA und OpsB in *A. alternata* lokalisiert werden. Durch Analyse der Aminosäuresequenzen durch die Softwares SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) und PrediSi (<http://www.predisi.de/>) konnten neben den bekannten Transmembrandomänen keine weiteren Lokalisationsdomänen identifiziert werden. Für die Familie der beta-Fassproteine, zu der auch Opsine gehören, ist das nicht ungewöhnlich, denn hier ist häufig die N-terminale Transmembrandomäne für den Transport zum korrekten Locus verantwortlich. Um hier eine Verfälschung der Lokalisierung zu vermeiden, wurden die Konstrukte so konzipiert, dass die GFP-Sequenz an den C-Terminus der jeweiligen Opsine angehängt wird. Da eine mögliche Überexpression durch einen unnatürlichen Promotor die Lokalisierung ebenfalls verfälschen kann, sollten die Promotoren der jeweiligen Opsin-Gene verwendet werden. Diese sind jedoch nicht bekannt. Deshalb wurden 1 kb stromaufwärts der ORFs vor die Konstrukte kloniert. Zur Selektion enthielten die Vektoren jeweils die *pyr-4*-Auxotrophiekassette. Die fertigen Vektoren pCP5 (*opsA(p)::opsA-gfp*) und pCP6 (*opsB(p)::opsB-gfp*) wurden mittels Protoplastentransformation in sMW24 eingebracht. Transformanten wurden bereits auf den primären Transformationsplatten selektiert, indem dem Regenerationsmedium kein Uracil/Uridin zugegeben wurde. Weiterhin wurden gewachsene Kolonien auf selektives mCDB überimpft. Hatten die Kolonien ausreichend Sporen gebildet, wurden Sporen abgenommen und in flüssigem mCDB auf abgeflamten Deckgläschen über Nacht oder für zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Da unter 96 Transformanten aus drei Transformationsansätzen mit pCP5 kein GFP-Signal beobachtet werden konnte, wurde der Bereich des möglichen Promotors auf eine Länge von 2 kb erweitert. Nach erneuter Transformation mit dem modifizierten Vektor konnte auch für das OpsA-GFP-Konstrukt ein Signal beobachtet werden. Zur erfolgreichen Expression des OpsB-GFP Konstrukts war 1 kb stromaufwärts des *opsB*-ORF ausreichend. Für jedes Konstrukt wurden mindestens drei Transformanten untersucht, die alle die gleiche GFP-Lokalisierung in den Zellen zeigten. Representativ wurde jeweils einer ausgewählt: Zur Visualisierung von OpsA der Stamm sCP7 und von OpsB sCP8.

3.6.1 OpsA und OpsB lokalisieren an unterschiedlichen Membranen

Da nun Stämme vorhanden waren, die GFP-markierte Versionen der Opsine unter ihrem jeweils natürlichen Promotor exprimierten, konnte genauer untersucht werden, in welchen Membranen OpsA und OpsB lokalisieren. In sCP7 konnte sowohl in den Sporen, als auch in den Hyphen ein GFP-Signal beobachtet werden, welches sich auf das Zellinnere beschränkte (**Abb. 21**). Am auffälligsten sind die großen, runden Strukturen an denen OpsA lokalisiert. Hierbei sollte es sich um die Vakuolen handeln. Daneben konnte das Signal an wesentlich kleineren, teilweise ebenfalls runden Strukturen ausgemacht werden. Es ist naheliegend, dass es sich hierbei um andere vakuolare Organellen, wie Transportvesikel oder Peroxisomen handelt. Im Vergleich des Signals einer Spore mit dem einer Hyphe wurde beobachtet, dass in den Sporen ein deutlich stärkeres Signal vorhanden ist.

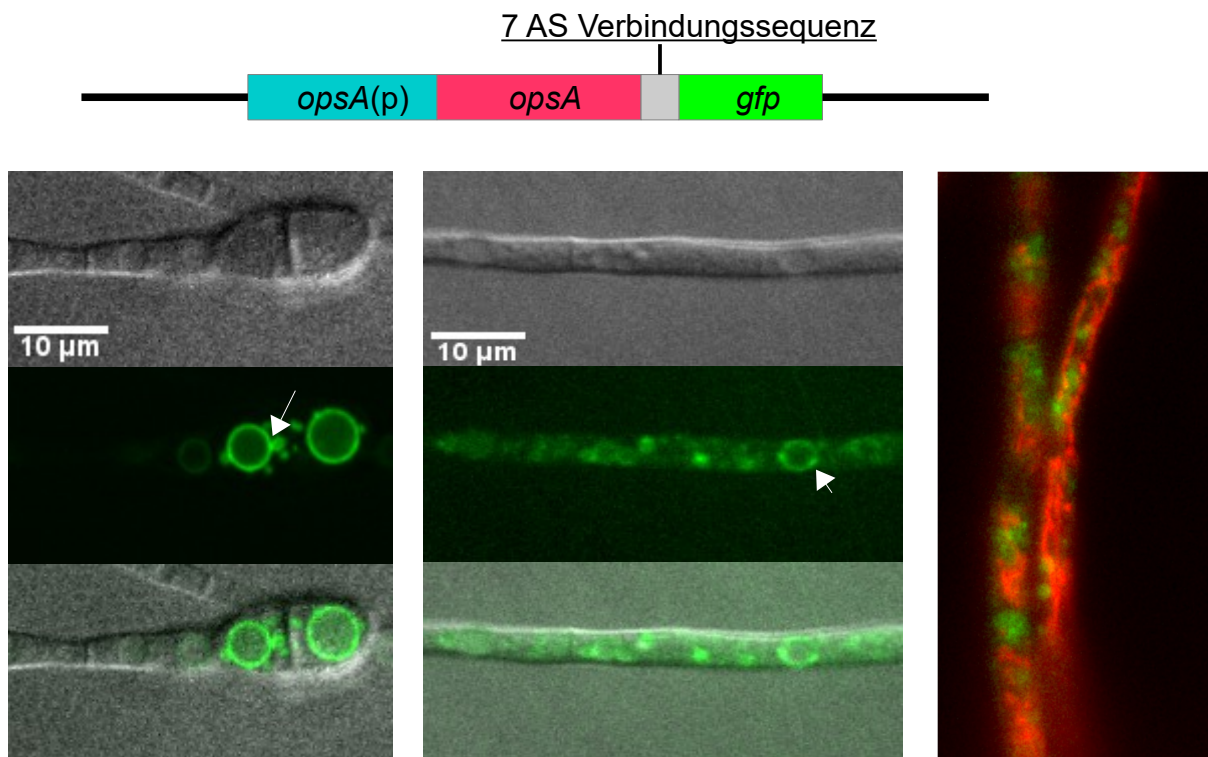


Abbildung 21: Lokalisierung von OpsA in *A. alternata*. Der Stamm sMW24 wurde mit dem Vektor pCP5 transformiert, der ein Konstrukt zur Expression eines GFP-getaggten OpsA unter natürlichem Promotor enthält (oben). OpsA lokalisiert an den großen, runde Vakuolen in den Sporen (links) und in Hyphen (Mitte) sowie an kleineren runden Vesikeln, die teilweise mit der Vakuole fusionieren (Pfeil), beziehungsweise von der Vakuole abkapseln. Zur Überprüfung einer möglichen Co-Lokalisierung von OpsA mit Mitochondrien wurden diese mit *Mitrotracker* eingefärbt (rechts, rot). Eine Lokalisierung an Mitochondrien konnte dadurch ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu lokalisierte OpsB im entsprechenden Stamm sCP8 fast ausschließlich an der Zytoplasmamembran und nicht an internen Membranen (**Abb. 22**). Es konnte lediglich in jüngeren Sporen und Hyphen ein schwaches Signal an inneren Strukturen ausgemacht werden. Da sich das Signal jedoch deutlich in der Zytoplasmamembran etablierte, ist davon auszugehen, dass OpsB sich in diesem Fall auf dem Weg zu seinem Zielort, der Plasmamembran, befand. Dieser Weg führt über das endoplasmatische Retikulum. Auch hier zeigten Sporen ein deutlich stärkeres Signal als Hyphen. In älteren Hyphen, die zwei Tage wuchsen, konnte sich das Signal etwas stärker ausprägen.

Es wurde im Vorfeld gezeigt, dass OpsA eine funktionelle, auswärtsgerichtete Protonenpumpe ist (Christoph Pinecker, 2016). Im Inneren der Zelle wäre die Lokalisation solch einer Protonenpumpe an den Mitochondrien sinnvoll, da die mitochondrialen H⁺ATPasen den Protonengradienten nutzen könnten, um daraus ATP zu erzeugen. Deshalb wurden mithilfe des invitrogen MitoTracker™ Red CMXRos die Mitochondrien gefärbt und die Proben nach einer Co-Lokalisation von OpsA und Mitochondrien untersucht. Diese konnte nach Betrachtung vieler Hyphen aus verschiedenen Probeansätzen ausgeschlossen werden (**Abb. 21**).

Als Negativkontrolle wurden der Wildtyp und sMW24 analog untersucht. Hier zeigte sich eine schwache Autofluoreszenz im Zytoplasma. Somit bestätigte sich, dass es sich bei den Signalen um die Opsin-GFP-Konstrukte handelte. Da OpsA und OpsB in unterschiedlichen Membranen lokalisieren, ist davon auszugehen, dass sie in der Entwicklung von *A. alternata* unterschiedliche Funktionen haben.

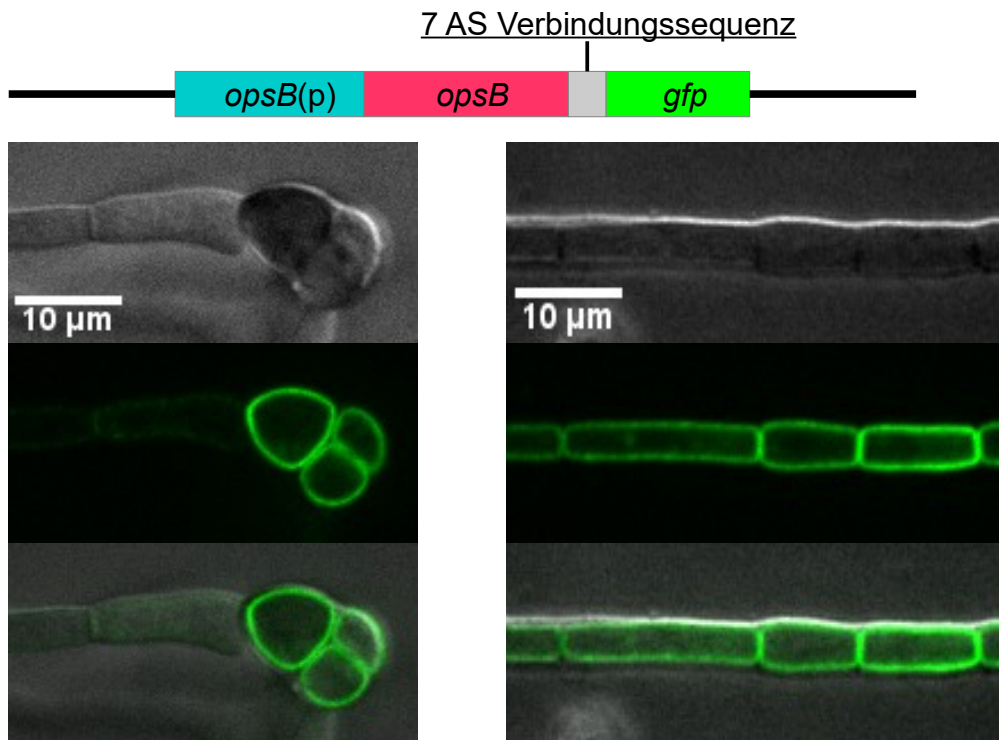


Abbildung 22: Lokalisierung von OpsB in *A. alternata*. Der Vektor pCP6 enthält die Sequenz für OpsB mit einem GFP am C-Terminus unter Kontrolle des natürlichen Promotors (oben) und wurde in *A. alternata* eingebracht. OpsB lokalisiert fast ausschließlich an der Zytoplasmamembran. Im Vergleich von Spore zu Hyphe (links) zeigt die Spore ein stärkeres Signal. In einer zwei Tage alten Hyphe (rechts) hat sich das Signal deutlich in der Zytoplasmamembran etabliert.

3.7 Untersuchung des Einflusses von pH auf *A. alternata*

Der pH-Wert ist wichtig für die Funktion vieler Enzyme und ein äußeres Signal, das die Entwicklung von Organismen beeinflusst. Der pH eines Habitats wird von der Zusammensetzung anorganischer Stoffe, aber auch von den Organismen, die es bewohnen, bestimmt. Darüber hinaus spielt der pH bei der Virulenz vieler filamentöser Pilze eine Rolle. Da eine Vielzahl an Opsinen Ionenpumpen sind und so den pH der Umgebung und des Zellinneren aktiv beeinflussen können, sollten die generierten Opsin-Mutanten auf ihr Verhalten bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden.

3.7.1 OpsA spielt eine Rolle beim Wachstum auf saurem und basischem Medium

Die Opsine OpsA und OpsB sind funktionale, auswärtsgerichtete Protonenpumpen. Dieser aktive Protonentransport könnte den pH-Wert im Zellinneren sowie dem Zelläußeren unter bestimmten Umständen verändern und so einen Vorteil für den Organismus darstellen. Es sollte getestet werden, ob die Opsin-defekten Stämme und der Wildtyp eine auffällige Reaktion im Wachstum auf Medium mit unterschiedlichem pH-Wert zeigen. Der pH-Wert ist maßgeblich für viele Reaktionen an Membranen. Er beeinflusst das Transportpotential von Ionenkanälen und wird wiederum vom Ionentransport beeinflusst. In *N. crassa* wurde gezeigt, dass WC-1 für die elektrochemischen Eigenschaften der Membran und somit auch für Ionentransport, also pH mitbestimmend ist. Deshalb wurde bei der Untersuchung der Reaktionen von pH auf das Koloniewachstum von *A. alternata* ein *wc-1*-Deletionsstamm ($\Delta wc-1$) mituntersucht. Hierfür wurden die Stämme und der Wildtyp auf mCDB-Agarplatten mit unterschiedlichen pH-Werten punktinokuliert und entweder in Dunkelheit oder mit Grünlichtbestrahlung bei 28 °C inkubiert. Der Standard pH-Wert des Kultivierungsmediums mCDB beträgt 5,5. Deshalb wurde einmal ein saurer pH von 3 und ein leicht basischer pH von 8 gewählt, die somit jeweils um einen Wert von 2,5 vom normalen Kultivierungs-pH abwichen. Nach 5 und nach 7 Tagen wurden die Kolonien in Augenschein genommen und vermessen (**Abb. 23**). Das Wachstum unter den Standardbedingungen (mCDB, pH 5,5, Dunkelheit) diente hier als Referenz. Die Bestrahlung der Kolonien mit Grünlicht für 5 Tage bei pH 5,5 führte zu einer Reduktion der Melanisierung, was durch die verminderte Sporenbildung zu erklären ist und bereits bekannt war. Die Ausnahme bildete $\Delta wc-1$. Er zeigte auch in Grünlicht nach fünf Tagen eine leichte Melanisierung, die beim Wildtyp und den Opsin-Deletionsstämmen nicht beobachtet wurde. Darüber hinaus führte die Bestrahlung mit Grünlicht in allen getesteten Stämmen, außer sCP2, zu kleineren Kolonien. Die Koloniegröße von sCP2 beim Wachstum in Grünlicht entsprach der Koloniegröße beim Wachstum in Dunkelheit. Wurden die Kolonien auf mCDB pH 3 für 5 Tage in Dunkelheit inkubiert, waren sie deutlich kleiner und zeigten keine Melanisierung. Die Bestrahlung mit Grünlicht führte bei sCP2 zu einem kleineren Koloniedurchmesser. Bei den restlichen Stämmen hatte die Bestrahlung mit Grünlicht keinen Effekt auf die Koloniegröße. Wuchsen die Stämme für 5 Tage bei pH 8 ohne Bestrahlung, zeigten sie im Vergleich zu Kolonien auf Medium mit dem pH 5,5 eine stärkere Melanisierung. Auch der Koloniedurchmesser war beim Wachstum auf pH 8

größer. Wurden die Platten mit Grünlicht bestrahlt, trat der selbe Effekt auf, der beim Wachstum mit pH 3 beobachtet wurde, bei pH 5,5 jedoch nicht. Die Bestrahlung hatte keinen Einfluss mehr auf die Koloniegröße, außer im Fall von sCP2, der eine deutlich kleinere Kolonie bildete.

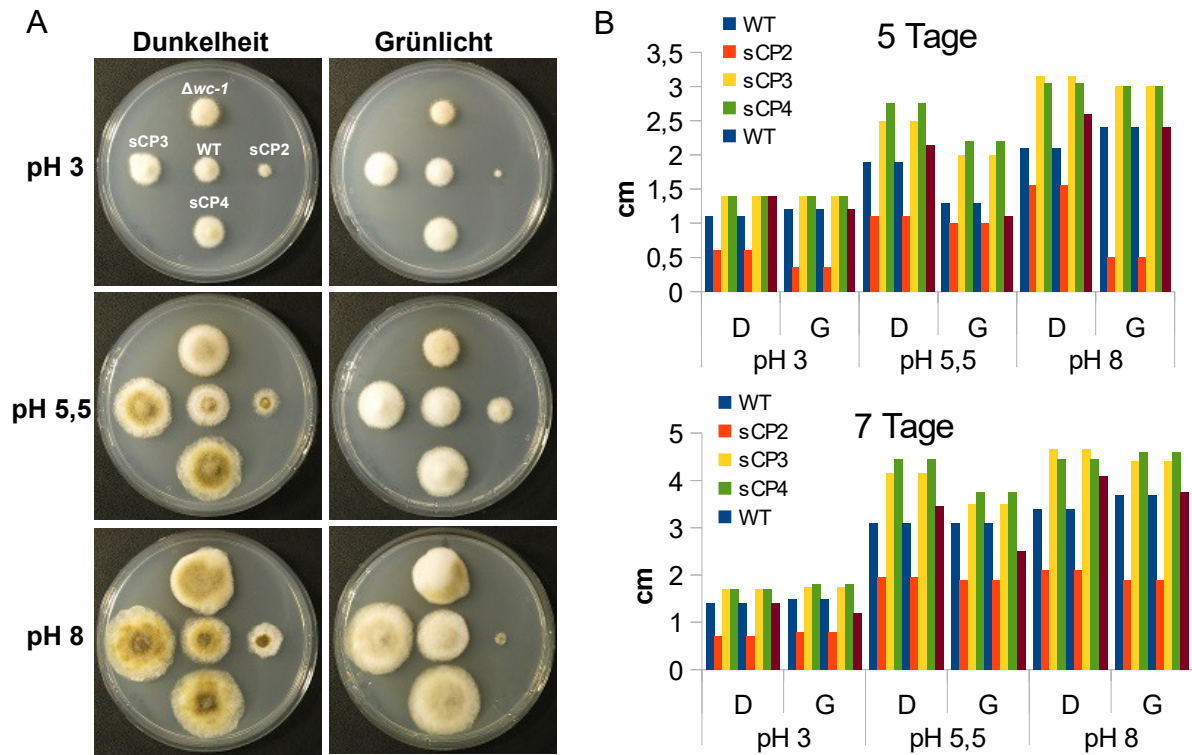


Abbildung 23: Untersuchung des Einflusses von pH und Grünlicht auf das Koloniewachstum. Die Standardkulturbedingungen von *A. alternata* entsprechen einem pH von 5,5 und Dunkelheit und diente hier als Referenz. Neben dem Wildtyp wurden die Opsin-defekten Stämme sowie ein Stamm in dem der prominente Blaulichtrezeptor und Transkriptionsfaktor WC-1 inaktiviert wurde ($\Delta wc-1$), untersucht. Die Stämme wurden auf saurem (pH 3) oder leicht basischem (pH 8) Medium punktinokuliert und entweder in Dunkelheit oder fortlaufender Bestrahlung mit Grünlicht bei 28 °C inkubiert. Für repräsentative Bilder wurden die Stämme zusammen auf einer Agarplatte inokuliert und nach 5 Tagen fotografiert (A). Zur Messung des Koloniedurchmessers wurden die Stämme einzeln auf Platten inokuliert und für 5 oder 7 Tage inkubiert (B). Sowohl pH als auch die Bestrahlung mit Grünlicht beeinflussten das Koloniewachstum. Dieser Einfluss fiel bei den untersuchten Stämmen teilweise sehr unterschiedlich aus. Der *opsA*-Inaktivierungsstamm sCP2 war am auffälligsten. Sein Koloniewachstum zeigte als einziger auf abweichendem pH eine Reaktion auf die Grünlichtbestrahlung. (sCP2: $\Delta opsA$; sCP3: $\Delta opsB$; sCP4: $\Delta opsA/\Delta opsB$)

Wurden die Platten für 7 Tage inkubiert, bildeten sie bei pH 5,5 und pH 8 größere Kolonien. Bei pH 3 war nach zwei Tagen längerer Wachstumszeit kein merklicher Zuwachs des Koloniedurchmessers zu beobachten. Interessanterweise konnte der Wildtyp als

einzigster Stamm nach 7 Tagen Wachstum auf pH 5,5 die Bestrahlung mit Grünlicht kompensieren und zeigte den gleichen Koloniedurchmesser wie beim Wachstum in Dunkelheit. Die interessantesten Beobachtungen wurden beim *opsA*-Inaktivierungsstamm gemacht. Er verhielt sich in Bezug auf pH und Lichtbestrahlung gegensätzlich zu den restlichen Stämmen, indem er bei neutralem pH keinen Einfluss der Bestrahlung auf den Koloniedurchmesser zeigte und bei nicht neutralem pH als einziger diesen Effekt zeigte.

3.7.2 A. *alternata* verändert den pH in seiner Umgebung

Aufgrund der Beobachtung, dass ein bestimmter pH-Bereich für das Wachstum von *A. alternata* förderlich ist, sollte untersucht werden, ob dieser Organismus auch aktiv den pH seines Milieus verändern kann und ob die Opsine dabei eine Rolle spielen. Um das zu untersuchen wurde der WT sowie sCP2, sCP3, sCP4 und $\Delta wc-1$ auf dem Standardkultivierungsmedium mCDB (pH 5,5) inkubiert, dem Bromkresolgrün in der Konzentration 67 mg/l zugesetzt wurde. Bromkresolgrün ist ein pH-Indikator, der in einem Bereich von pH 3,8 – 5,4 von gelb über grün nach tiefblau umschlägt (**Abb. 24 A**), sodass eine mögliche Ansäuerung des Mediums und vermeintliche Unterschiede zwischen den Stämmen mit bloßem Auge erkennbar sind. Die mit Bromkresolgrün versetzten Agarplatten waren nach dem Gießen tiefblau. Nach Erkalten wurden sie mit den Stämmen punktinokuliert und bei 28 °C in Dunkelheit inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Platten betrachtet (**Abb. 24 A**). Der Wildtyp sowie alle anderen verwendeten Stämme hatten das Medium angesäuert, sodass sich ein gelber Ring um die gewachsenen Kolonien gebildet hatte. Das Wachstum der Kolonien fiel unterschiedlich groß aus und entsprach den bereits gemachten Beobachtungen. sCP2 war stark im Wachstum eingeschränkt, wohingegen sCP3, sCP4 und $\Delta wc-1$ einen etwas größeren Koloniedurchmesser aufwiesen, als der Wildtyp. Die gelben Umrandungen der Kolonien schienen ebenfalls unterschiedlich groß auszufallen. Um festzustellen, ob es sich hierbei tatsächlich um einen Phänotyp der Mutantenstämme handelte oder die Ansäuerung des Mediums lediglich mit der Koloniegröße korrelierte, wurden die Kolonien und die gelb gefärbten Flächen im Medium genau vermessen (**Abb. 24 B**). Nach drei Tagen Wachstum im Dunkeln bildete der Wildtyp eine Kolonie mit dem Radius 0,33 cm. Der Radius vom Inokulationspunkt beziehungsweise dem Zentrum der Kolonie bis zum Rand des Farbumschlagbereichs betrug 1,26 cm. Daraus ergibt sich eine Weite von 0,93 cm, die der Wildtyp vom Rand seiner Kolonie bis ins Medium angesäuert hatte. Verglichen dazu bildete sCP2 nur einen Kolonieradius von 0,24 cm, einen Ansäuerungsradius von 0,39 cm und eine

Ansäuerungsweite von 0,15 cm ins Medium hinein. Um diese Werte besser miteinander vergleichen zu können, wurde der Quotient aus Ansäuerungsweite und Kolonieradius gebildet (Ansäuerungsweite/Kolonieradius). In diesem Quotienten unterschieden sich der Wildtyp (2,83) und sCP2 (0,61) um einen Faktor von 4,8. Die restlichen untersuchten Stämme sCP3, sCP4 und $\Delta wc-1$ bildeten, verglichen mit dem Wildtyp, leicht größere Kolonieradien und bildeten augenscheinlich vergleichbare gelbe Umrundungen um ihre Kolonien. Beispielsweise wurde für $\Delta wc-1$ im Durchschnitt ein Kolonieradius von 0,61 cm, ein Ansäuerungsradius 1,31 cm und eine Ansäuerungsweite von 0,7 cm gemessen. Der daraus resultierende Quotient von 1,3 unterscheidet sich vom Wildtyp um den Faktor 2,2 und stützt die Beobachtung, dass in diesem Stamm trotz größerer Kolonie ein in etwa vergleichbarer, also im Verhältnis kleinerer Bereich, im Medium angesäuert wurde. Dieses Verhältnis trifft auch auf sCP3 und sCP4 zu. SCP3 wich mit dem errechneten Quotienten 1,76 (aus 0,48 cm Koloniedurchmesser und 0,83 cm Ansäuerungsweite) am geringsten vom Wildtyp ab. Die durchschnittliche Koloniegröße von sCP4 betrug 0,6 cm und entspricht etwa der Koloniegröße von $\Delta wc-1$ (0,61). Seine Ansäuerungsweite war mit 0,75 cm 5 mm länger als die von $\Delta wc-1$ und spricht, im direkten Vergleich beider Stämme, für ein größeres Potential das Medium anzusäuern. Mit dem Quotienten von 1,56 ist er in dieser Hinsicht dem Wildtyp ähnlicher. Obwohl sich sCP2 und $\Delta wc-1$ im Kolonienwachstum stark unterscheiden, zeigten beide nach 3 Tagen Inkubation ein stark vermindertes Potential ihre Umgebung anzusäuern.

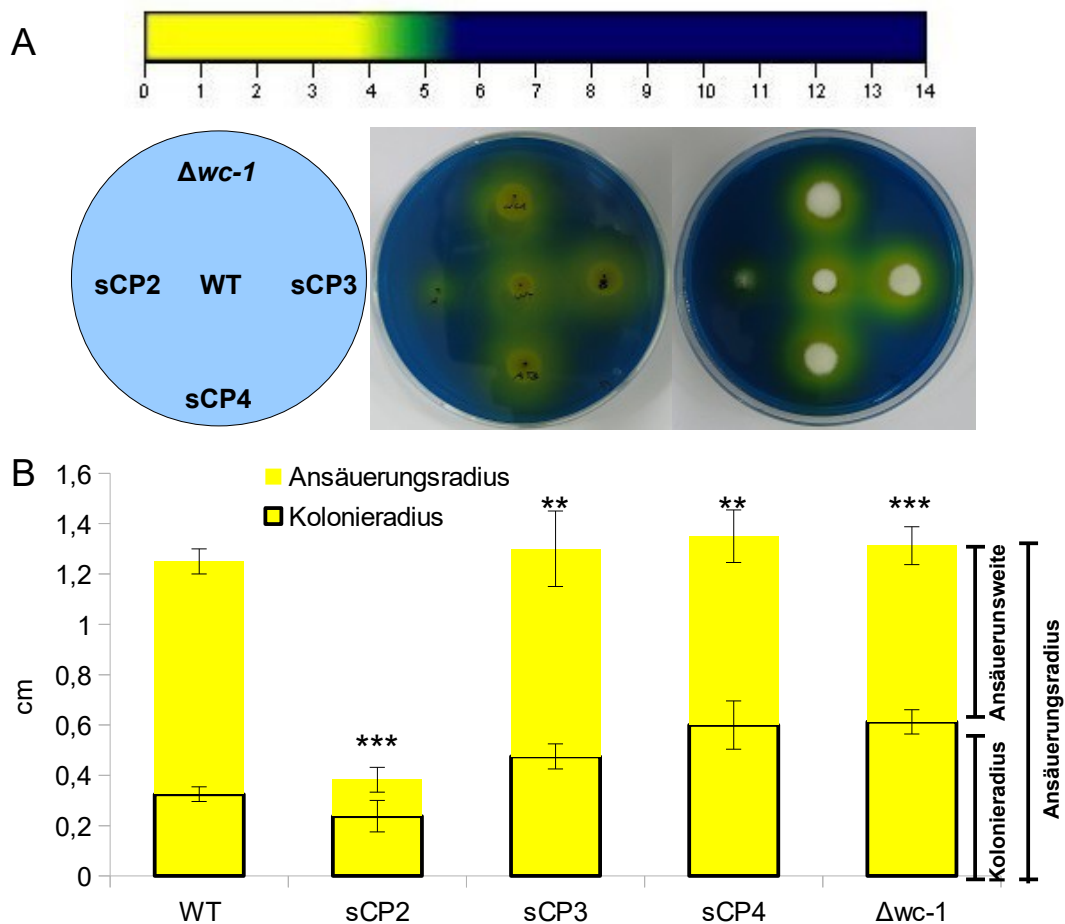


Abbildung 24: Untersuchung des Einflusses von *A. alternata* auf den pH seiner Umgebung. Der Wildtyp, sCP2 ($\Delta opsA$), sCP3 ($\Delta opsB$), sCP4 $\Delta opsA/\Delta opsB$) und $\Delta wc-1$ wurden auf mCDB-Agarplatten, die mit Bromkresolgrün (67 mg/l) versetzt wurden, inokuliert und für drei Tage bei 28 °C und Dunkelheit inkubiert. **A:** Die Skala zeigt den Farbumschlag, von Bromkresolgrün von gelb, bei saurem pH zu blau, bei basischem pH an (oben). Die gelbe Umrandung der Kolonien zeigt eine Ansäuerung des Mediums in der unmittelbaren Umgebung der Kolonien. **B:** Zur Quantifizierung des Effekts wurden die Kolonien und die gelben Umrandungen der Kolonien vermessen. Die verschiedenen Stämme besitzen unterschiedliche Potentiale ihre Umgebung anzusäuern, die nicht mit der Koloniegröße zu korrelieren scheinen. sCP2 zeigte hier das geringste Potential. Die Ansäuerungsweite beschreibt die Distanz, die über den Rand der jeweiligen Kolonie hinaus das Medium zu Gelb umgeschlagen war. Der Ansäuerungsradius beschreibt den Radius des verfärbten Mediums vom Zentrum der Kolonie aus. Der Versuch wurde im Quadruplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Zur statistischen Analyse wurde der Quotient aus Ansäuerungsweite und Kolonieradius gebildet und mit *Student's t-test* untersucht, ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$.

Die Ansäuerung des Mediums durch *A. alternata* wurde auch über einen längeren Zeitraum beobachtet (**Abb. 25 A**). Diesmal wurden die Platten bei Raumtemperatur und natürlichem Tag-Nachtwechsel inkubiert. Nach 4 Tagen begann sich das Medium, vom Zentrum der Kolonie ausgehend, unter dem Wildtyp, sCP3 und sCP4 wieder blau zu färben und zeigte somit eine Veränderung des pH-Wertes in den basischen Bereich an,

wobei der Farbumschlag unter der Wildtypkolonie das tiefste Blau zeigte und im Verhältnis zur Koloniegröße am größten war. Der Bereich um und unter $\Delta wc-1$ war nach wie vor gelb und sCP2 hatte das Medium um sich herum noch kaum angesäuert. Nach 5 Tagen war der blaue Farbumschlag ein Stück über den Rand der Wildtypkolonie hinaus ausgebreitet. Bei sCP3 traf dies in geringerem Maß ebenfalls zu, wobei der Farbumschlag bei sCP4 gerade den Rand der Kolonie erreicht hatte. $\Delta wc-1$ und sCP2 zeigten von Tag 4 auf Tag 5 kaum eine Veränderung und das bromkresolgrünhaltige Medium war auch unter dem Zentrum der Kolonien gelb. Nach 6 Tagen war auch unter der Kolonie von $\Delta wc-1$ der Farbumschlag zurück zu blau und somit eine Alkalisierung des Mediums sichtbar. Der Wildtyp, sCP3 und sCP4 hatten das Medium um ihre Kolonien großräumig alkalisiert. Im Gegensatz dazu zeigte sCP2 zu diesem Zeitpunkt eine starke Ansäuerung des Mediums. Nach 10 Tagen war das Medium um die Kolonie von sCP2 wieder blau gefärbt, sodass die ganze Platte wieder blau war. Somit zeigten alle Stämme eine initiale Ansäuerung des Mediums mit einer anschließenden Alkalisierung. Dieser Vorgang geschah beim Wildtyp am schnellsten, gefolgt von sCP3 und sCP4. Der Stamm mit inaktiviertem, zentralem Blaulichtrezeptorhomolog WC-1, $\Delta wc-1$, brauchte deutlich länger um von der initialen Ansäuerung zur anschließenden Alkalisierung zu wechseln und von allen untersuchten Stämmen brauchte der OpsA-defekte Stamm sCP2 am längsten für diesen Wechsel. Interessanterweise verhält sich hier der Doppel-Deletionsstamm der Opsine auch wie der *opsB*-Deletionsstamm und nicht wie der *opsA*-Deletionsstamm.

Um diesen Effekt genauer zu quantifizieren, sollten nun verschiedene Stämme in flüssigem Medium inkubiert werden, um mit Hilfe einer pH-Elektrode eine präzise Messung im Medium durchführen zu können. Als Referenz diente der Wildtyp. Da dieser Effekt offenbar von OpsA abhängig ist, sollte in erster Linie sCP2 hierauf untersucht werden. Es wurde bereits beobachtet, dass auch $\Delta wc-1$ eine starke Retardierung in diesem Vorgang aufweist, obwohl sein Koloniewachstum mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Da jedoch auch bei diesem Stamm das Verhalten stark vom Wildtyp abwich, wurde hier auch $\Delta wc-1$ genauer untersucht. Die oben beschriebenen Beobachtungen lassen auch die Vermutung zu, dass möglicherweise eine Verbindung, physikalisch oder funktionell, zwischen OpsA und WC-1 besteht. Um gänzlich ausschließen zu können, dass der für sCP2 beobachtete Effekt vom retardierten Wachstum des Stammes abhängig war, wurde zusätzlich ein Stamm mit Mutation im globalen Stress-Regulator HogA (High osmolarity glycerol A) untersucht, was zu dessen Inaktivierung führte: $\Delta hogA$. Der *hogA*-Deletionsstamm weist auf Kolonieebene ein stark eingeschränktes Wachstum auf (Igbalajobi *et al.*, 2019), das in

etwa mit sCP2 vergleichbar ist. Zur Untersuchung der Beeinflussung des pH-Wertes der Umgebung wurden von den ausgewählten Stämmen Sporensuspensionen in sterilem dH₂O erstellt. Anschließend wurden 150 ml mCDB in Erlenmeyerkoblen mit jeweils 7.500 Sporen inokuliert und diese bei 28 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Weiterhin sollte getestet werden, ob Licht einen maßgeblichen Einfluss auf diesen Effekt hat. Hierfür wurden die Kulturen in natürlichem Tag-Nacht-Wechsel inkubiert. Im Abstand von 24 Stunden wurde das gewachsene Myzel abfiltriert und der pH-Wert des Wachstumsmediums mit einer pH-Elektrode gemessen (**Abb. 25 B**).

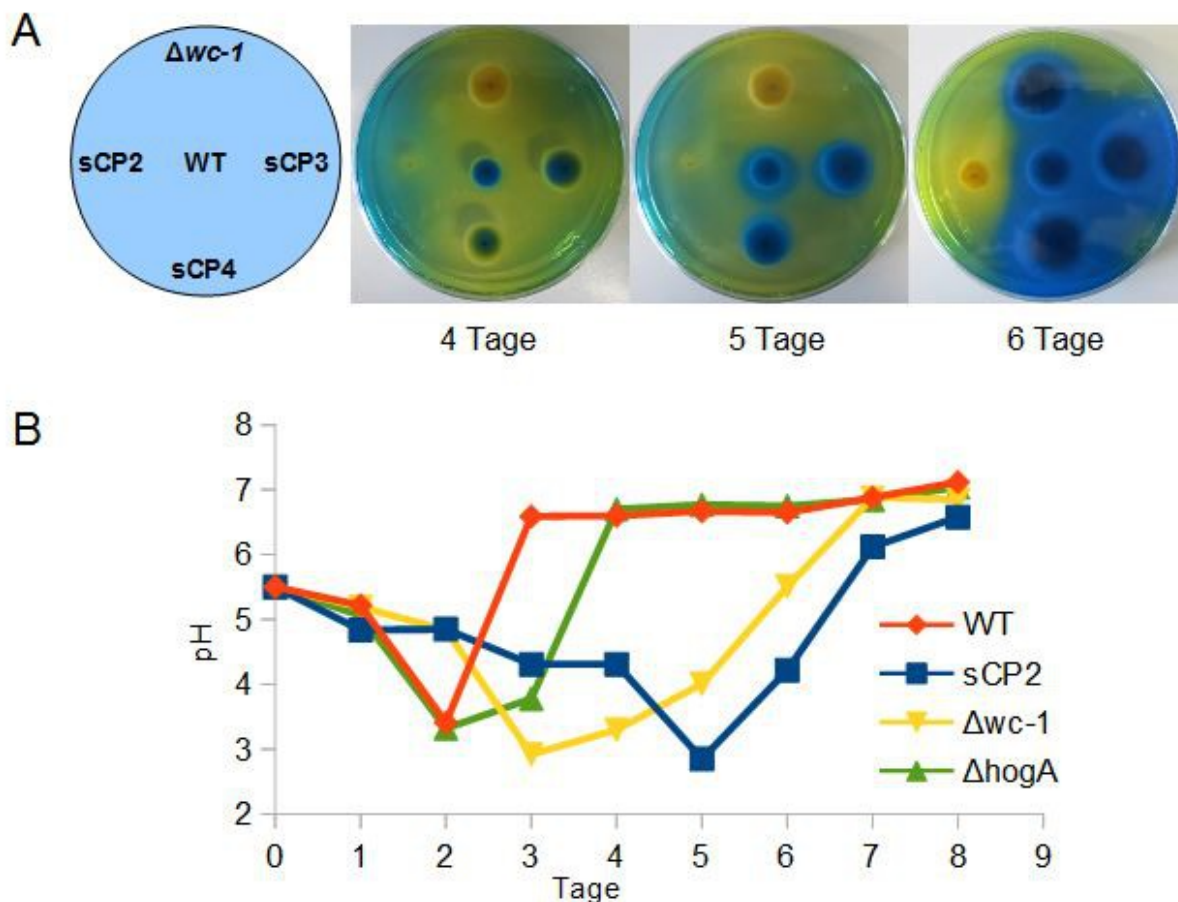


Abbildung 25: Untersuchung des Einflusses von *A. alternata* und den Opsinen auf den pH der Umgebung über einen längeren Zeitraum. A: Der Wildtyp sowie die Stämme sCP2 ($\Delta opsA$), sCP3 ($\Delta opsB$), sCP4 ($\Delta opsA/\Delta opsB$) und $\Delta wc-1$ wurden auf bromkresolgrünhaltigem Medium (67 mg/l) punktinokuliert und über mehrere Tage hinweg beobachtet. Nach einer initialen Ansäuerung des Mediums (Farbumschlag zu gelb) alkalisiert *A. alternata* das Medium wieder. Dieser Vorgang geschieht beim WT am schnellsten. SCP3 und sCP4 brauchen zur Alkalisierung des Mediums nur ein wenig länger als der WT. Bei $\Delta wc-1$ dauerte der Wechsel zur Alkalisierung wesentlich länger. SCP2 brauchte für diesen Vorgang jedoch am längsten. **B:** Zur präziseren Quantifizierung des Effekts wurden der WT, sCP2 und $\Delta wc-1$ in Flüssigmedium angeimpft. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt von sCP2 auf sein eingeschränktes Kolonienwachstum zurückzuführen ist, wurde zusätzlich ein $\Delta hogA$ -Stamm untersucht, der ein vergleichbares Kolonienwachstum aufweist (Igbalajobi *et al.*, 2019). Der Versuch konnte die verlängerte Ansäuerungsphase von sCP2 und $\Delta wc-1$ bestätigen und zeitgleich ausschließen, dass dieser Effekt lediglich vom verminderten Wachstum herrührt.

Nach einer Latenzphase von einem Tag begannen alle Stämme das Medium in unterschiedlichem Maß anzusäuern. Am ersten Tag nach Inokulation der Kolben waren nur kleine Veränderungen des pH-Werts in Richtung sauer zu verzeichnen, mit Ausnahme von sCP2, der den pH des Mediums bereits um 0,66 Einheiten vermindert hatte (WT: 5,22; sCP2: 4,84; $\Delta wc-1$: 5,19; $\Delta hogA$: 5,06). Nach zwei Tagen betrug der pH-Wert des Mediums vom Wildtyp 3,41 und der des $\Delta hogA$ -Stamms 3,32. sCP2 und $\Delta wc-1$ waren, wie auf den Bromkresolgrünplatten beobachtet, langsamer und im jeweiligen Medium konnte ein pH-Wert von 4,85 (sCP2) und 4,84 ($\Delta wc-1$) gemessen werden. Nach drei Tagen Inkubation war der pH-Wert des Mediums von sCP2 ein bisschen weiter auf 4,31 gesunken. $\Delta wc-1$ verzeichnete nach drei Tagen seinen pH-Tiefpunkt mit 2,92. Danach wechselte dieser Stamm zur Alkalisierung des Mediums, sodass der pH-Wert stetig anstieg. Im Gegensatz dazu war der pH-Wert des Mediums von $\Delta hogA$ bereits wieder um 0,46 Einheiten auf 3,78 gestiegen. Der WT hingegen hatte nach drei Tagen seinen pH-Tiefpunkt bereits weit überschritten und das Medium schon auf den Wert 6,59 gebracht. Dieser Wert stellte einen Stagnationspunkt dar, sodass der pH-Wert des Mediums des Wildtyps in den folgenden Tagen nur noch vergleichsweise langsam auf einen Wert von 7,12 nach 8 Tagen anstieg. Am vierten Tag war der pH-Wert bei $\Delta hogA$ auf 6,70 angestiegen und stieg, analog zum Wildtyp, nur noch langsam auf einen Wert von 7,04 an Tag 8. Nach vier Tagen wurde im Medium von $\Delta wc-1$ ein pH-Wert von 3,3 gemessen. Somit war hier im Vergleich zum Wildtyp und $\Delta hogA$ ein wesentlich langsamerer Anstieg zu verzeichnen. sCP2 hingegen wies mit 4,31 denselben pH-Wert wie am Vortag auf. Nach 5 Tagen war der pH-Wert des Mediums von $\Delta wc-1$ langsam, jedoch stetig auf 4,01 angestiegen. sCP2 verzeichnete am fünften Tag sein pH-Minimum von 2,85. Am darauffolgenden Tag konnte hier bereits ein pH-Wert von 4,22 gemessen werden, wohingegen $\Delta wc-1$ das Medium schon wieder auf einen neutralen pH von 5,5 gebracht hatte. Nach 7 Tagen überstieg der pH-Wert der Medien aller getesteten Stämme 6 Einheiten. Nach 8 Tagen war auch der pH-Wert des Mediums von sCP2 und $\Delta wc-1$ nur noch leicht gestiegen. Die Entwicklung von initialer Ansäuerung des Mediums unter einen Wert von pH 3,5 mit anschließender Alkalisierung auf einen Wert von etwa pH 7 konnte bei allen getesteten Stämmen beobachtet werden. Die Geschwindigkeit, mit welcher sie diesen Prozess durchführten, war bei sCP2 und $\Delta wc-1$ stark abweichend vom Wildtyp. Während sCP2 sehr lange brauchte, das Medium auf einen niedrigen pH zu bringen, geschah das bei $\Delta wc-1$ zwar etwas schneller. Dafür war die Alkalisierungsrate von $\Delta wc-1$ etwas langsamer, wohingegen sCP2 diesen Vorgang relativ rasch bewerkstelligte. Die pH

Tief- und Höchstwerte wichen weniger stark voneinander ab.

3.7.3 Bestrahlung mit Licht beeinflusst den Ansäuerungs-Alkalisierungsprozess im WT und sCP2

Nun sollte getestet werden, ob Licht verschiedener Wellenlängen einen Einfluss auf den Ansäuerungs-Alkalisierungsprozess von *A. alternata* auf seine Umgebung hat. Dafür wurden der WT und die Stämme sCP2, sCP3 und sCP4 in der Mitte einer bromkresolgrünhaltigen mCDB-Agarplatte punktinokuliert und bei 28 °C mit Dauerbestrahlung von entweder Rotlicht (700 nm), Grünlicht (525 nm), Blaulicht (450 nm) oder in Dunkelheit für eine Woche inkubiert. Anschließend wurden die Platten betrachtet und fotografiert (**Abb. 26**). Es zeigte sich, dass der Wildtyp in Dunkelheit das Medium bereits vollständig alkalisiert hatte. Wurde er mit Rotlicht bestrahlt, war am Rand der Platte noch deutlich ein grün-gelber Ring zu sehen, was bedeutet, dass der Wildtyp später begann das Medium nach der initialen Ansäuerung zu alkalisieren und dieser Prozess somit durch Bestrahlung mit Rotlicht retardiert wird. Bei der Bestrahlung mit Grünlicht war auf der Platte ebenfalls noch ein grün-gelber Rand erkennbar, dieser war jedoch im Vergleich zur Bestrahlung mit Rotlicht kleiner und zeigt somit eine geringere Retardierung der Alkalisierung an. Wurde der Wildtyp mit Blaulicht bestrahlt, zeigte die Platte ein Muster, das mit der Rotlicht bestrahlten Platte vergleichbar war. Auch hier war noch ein grün-gelber Ring am Rand der Platte, welcher jedoch, im Vergleich mit der Grünlicht bestrahlten Platte, größer war. Das ist interessant, da in **3.4.1** beobachtet wurde, dass sich die Bestrahlung mit Rotlicht und Blaulicht auf die Sporenproduktion gegenteilig auswirkt. Für den Stamm sCP2 ergab sich ein ganz anderes Bild. Wurde dieser Stamm in Dunkelheit inkubiert, hatte sich nach einer Woche ein gelber Ring um die Kolonie gebildet. Am Rand der Platte war das Medium noch blau. Das zeigt an, dass der Stamm noch im Prozess der Ansäuerung war. Bei der Bestrahlung mit Rotlicht war die Ansäuerung des Mediums weiter fortgeschritten und der Rand der Platte zeigte bereits eine grün-gelbe Farbe. Auf der Platte, die mit Grünlicht bestrahlt wurde, war dieser Fortschritt gesteigert. Um die Kolonie hatte sich ein breiter Ring aus sattem Gelb gebildet. Für sCP2 war der Prozess unter Bestrahlung mit Blaulicht am weitesten fortgeschritten, denn hier hatte sich um die Kolonie bereits ein blauer Ring gebildet, der anzeigte, dass die Kolonie das Medium alkalisierte. Somit wirkte sich die Bestrahlung mit Blaulicht und die Inkubation in Dunkelheit auf den

Wildtyp und sCP2 gegenteilig aus. Die Stämme sCP3 und sCP4 hatten zu diesem Zeitpunkt die Platten bei sämtlichen Bedingungen alkalisiert. Lediglich bei der Bestrahlung mit Blaulicht war noch ein kleiner grün-blauer Ring am Rand der Platte erkennbar.

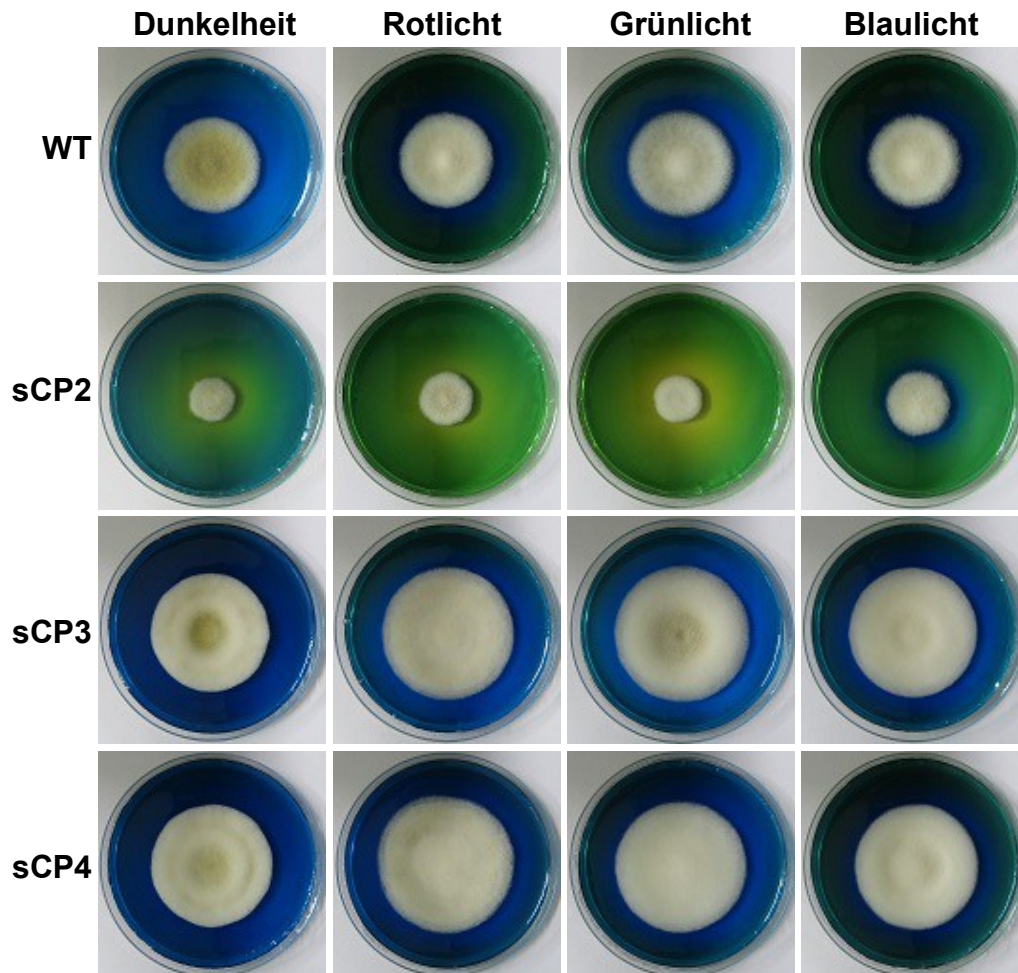


Abbildung 26: Untersuchung des Einflusses von Licht auf die Ansäuerung und anschließende Alkalisierung des Mediums von *A. alternata*. Das Standardmedium für *A. alternata* mCDB-Agar (pH 5,5) wurde mit dem pH-Indikator Bromkresolgrün (67 mg/l) versetzt. Darauf wurde der WT und die Opsin-Mutanten sCP2 ($\Delta opsA$), sCP3 ($\Delta opsB$) und sCP4 $\Delta opsA/\Delta opsB$ punktinokuliert und für eine Woche entweder in Dunkelheit oder bei Dauerbestrahlung mit einer bestimmten Lichtfarbe inkubiert. Die Opsin-defekten Stämme sCP3 und sCP4 hatten nach der Inkubationszeit das Medium, nach der initialen Ansäuerung, fast vollständig alkalisiert. Beim Wildtyp führte die Bestrahlung mit sämtlichen Lichtfarben zu einer Retardierung der Alkalisierung in unterschiedlichem Maße. Bei sCP2 bewirkte die Bestrahlung mit Licht das Gegenteil. Hier beschleunigte die Bestrahlung mit Licht den Vorgang der Ansäuerung. Dieser Effekt war bei der Bestrahlung mit Blaulicht am stärksten, sodass die sCP2-Kolonie bereits mit der Alkalisierung begonnen hatte.

3.8 Untersuchung der Keimungsrate von *A. alternata*

Sporen sind für Pilze ein Schlüsselstadium zur Verbreitung. Darüber hinaus sind sie ein guter Schutz des Genoms gegen Umwelteinflüsse. Die Keimung der Sporen ist der erste Schritt eine neue Umgebung zu kolonisieren und wird typischerweise durch Nährstoffe ausgelöst. Beispielsweise ist Gpr-1, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) aus *S. cerevisiae*, verantwortlich für die Wahrnehmung von Glukose und löst die Keimung von Ascosporen aus (Tingle *et al.*, 1974; Kraakman *et al.*, 1999). In Ascomyceten sind die molekularen Details, die der Keimung zu Grunde liegen, jedoch nicht ausreichend erforscht. Ein umfangreiches Verständnis der molekularen Ereignisse, die während der Keimung vorkommen, kann dabei helfen, die Virulenz von filamentösen Pilzen zu kontrollieren. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrads von Opsinen zu GPCRs, dem hohen Vorkommen von OpsA und OpsB in den Sporen sowie der Tatsache, dass ein Einfluss von Licht auf die Keimung von Sporen von *A. alternata* bereits gezeigt werden konnte (Igbalajobi *et al.*, 2019), sollte eine mögliche Rolle der Opsine auf die Keimung untersucht werden.

3.8.1 Die Inaktivierung von *opsB* führt zu einer reduzierten Keimungsrate

Im Standard-Kultivierungsmedium von *A. alternata*, mCDB, keimen die Sporen bei 28 °C ohne Verzögerung aus. Um möglichen Einfluss verschiedener Parameter besser feststellen zu können, mussten hier andere Kultivierungsbedingungen verwendet werden. Wird die Glukose im Medium mit 1 % Glycerin ersetzt und die Kulturen bei 22 °C inkubiert, so sind nach zwei Stunden etwa die Hälfte der Sporen des Wildtyps und nach drei Stunden fast alle Sporen ausgekeimt. Zur Untersuchung einer möglichen Rolle der Opsine bei der Keimung wurden 20.000 Sporen vom Wildtyp sowie sCP2, sCP3 und sCP4 in 400 µl Minimal-mCDB auf einem Deckgläschen angeimpft und bei 22 °C entweder in Dunkelheit oder Dauerbestrahlung mit Grünlicht inkubiert. Anschließend wurden die Proben unter dem Mikroskop betrachtet und der Anteil an Sporen, die bereits einen deutlich sichtbaren Keimschlauch gebildet hatten, ausgezählt (**Abb. 27**). Beim Wildtyp betrug der Anteil an ausgekeimten Sporen nach zwei Stunden in Dunkelheit 46 %. Die Bestrahlung mit Grünlicht hemmte die Keimung, sodass hier der Anteil 35 % betrug. In Dunkelheit konnte beim Stamm sCP2 keine Änderung in der Keimungsrate festgestellt werden (45,67 %). Die Bestrahlung mit Grünlicht war in diesem Stamm jedoch potenter

und führte zu einer größeren Reduktion der Keimungsrate auf 20,33 %. Die Inaktivierung von *opsB* führte dazu, dass der Grünlichteffekt auf die Keimung verloren ging. Beide *OpsB*-defekten Stämme zeigten nach zwei Stunden der Inkubation in Dunkelheit oder mit Grünlichtbestrahlung einen vergleichbaren Anteil an ausgekeimten Sporen, der im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer war. Das waren für sCP3 in Dunkelheit 22,67 %, in Grünlicht 19 % sowie für sCP4 in Dunkelheit 18,33 % und in Grünlicht 21 %. Diese Werte entsprechen in etwa der Keimungsrate von sCP2 während Grünlichtbestrahlung. Auch hier zeigten der *opsB*- und der Doppel-Deletionsstamm den gleichen Effekt. Nach drei Stunden Inkubation in Dunkelheit waren bereits 90,67 % der Wildtypsporen ausgekeimt. Durch die Bestrahlung mit Grünlicht wurde die Keimungsrate nach drei Stunden um 30 % auf 60,33 % reduziert. Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil an ausgekeimten Sporen von sCP2 in Dunkelheit, verglichen mit dem Wildtyp leicht reduziert (80,33 %), dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Keimungsrate während Bestrahlung mit Grünlicht war hier auch noch deutlich geringer als von Wildtypsporen (29,33 %). Nach drei Stunden Inkubation unter Grünlicht unterschied sich auch die Keimungsrate von sCP2 von den Keimungsraten von sCP3 und sCP4, indem sie geringer war. sCP3 zeigte in Dunkelheit eine Keimungsrate von 48 % und in Grünlicht 49,33 %. Für sCP4 wurde eine Keimungsrate von 48,67 % in Dunkelheit und 42 % während Grünlichtbestrahlung ermittelt. Für diese Stämme war also nach wie vor die grünlichtabhängige Hemmung der Keimung nicht vorhanden und auch zu diesem Zeitpunkt betrug ihre Keimungsrate ungefähr die Hälfte des Wildtyps.

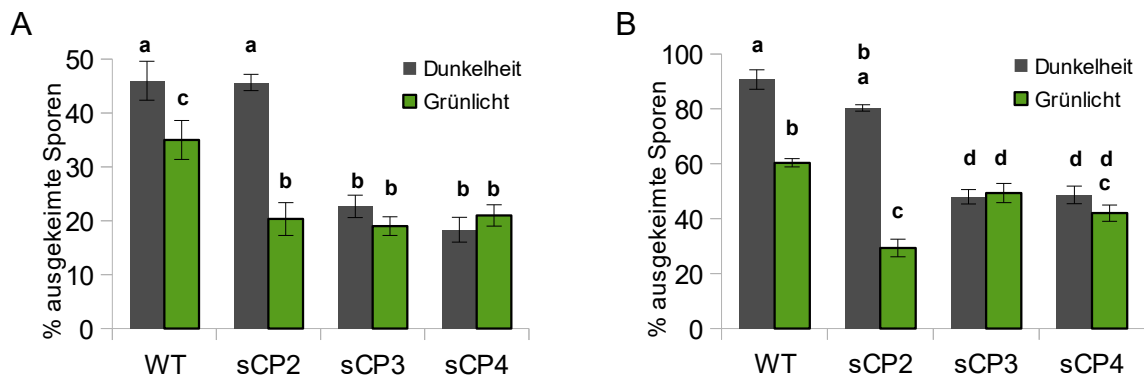


Abbildung 27: Bestimmung der Keimungsrate des Wildtyps und der Opsin-Deletionsstämme. Jeweils 20.000 Sporen wurden in 400 μ l mCDB mit 1 % Glycerin anstatt 4 % Glukose für 2 h (A) und für 3 h (B) in Dunkelheit oder Dauerbestrahlung mit Grünlicht bei 22 °C inkubiert. Die Bestimmung der Keimungsrate erfolgte lichtmikroskopisch. Während die Bestrahlung mit Grünlicht im Wildtyp und sCP2 ($\Delta opsA$) zu einer Hemmung der Keimung führte, konnte dieser Effekt für sCP3 ($\Delta opsB$) und sCP4 ($\Delta opsA/\Delta opsB$) nicht beobachtet werden. Desweiteren führte die Inaktivierung von OpsB bereits in Dunkelheit zu einer starken Reduktion der Keimungsrate. Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden jeweils drei mal 100 Sporen gezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Für die statistische Analyse wurde der Conover Test ohne anschließende p-Wert Korrektur durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an.

3.8.2 Der pH-Wert beeinflusst die Keimungsrate

Um ein besseres Verständnis der Rolle von Opsinen in der Sporenkeimung zu erlangen, sollten die Keimungsraten bei verschiedenen pH-Werten bestimmt werden. Hierfür wurde mCDB wie in 3.8.1 beschrieben abgewandelt und der pH von 5,5 jeweils um 1,5 Einheiten in den sauren, beziehungsweise den basischen Bereich, verändert. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu 3.8.1. Nach zwei Stunden (Abb. 28 A) zeigte sich beim Wildtyp unter Normalbedingung von pH 5,5 die Hemmung der Sporenkeimung durch Grünlicht um etwa 10 %. In Dunkelheit zeigte sich sowohl bei pH 4 (Keimungsrate: 18 %) als auch bei pH 7 (Keimungsrate 24,67 %) eine signifikante Reduktion der Keimung im Vergleich zu pH 5,5. Bei den bestrahlten Proben zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Keimung im Vergleich zu pH 5,5 (pH 4: 17 %, pH 7: 24,67 %). Die Keimungsraten der abweichenden pH-Werte in Grünlicht entsprachen in etwa denen in Dunkelheit, was dafür spricht, dass die Hemmung der Keimung durch sauren oder basischen pH dominanter ist, als durch Grünlicht und sich diese Effekte nicht aufsummieren. Für sCP2 konnte dasselbe beobachtet werden. Auch hier konnte wieder eine Reduktion der Keimung durch Bestrahlung mit Grünlicht sowie durch abweichende pH-Werte verzeichnet werden. Hier schien der Effekt des pH-Werts ebenfalls dominant über die Bestrahlung mit Grünlicht zu sein. Die Keimungsraten von sCP3 und sCP4 für pH 4 und pH 7 entsprachen in etwa denen von Wildtyp und sCP2. Die Keimungsrate dieser Stämme bei pH 5,5 war, wie

bereits in **3.8.1** beobachtet, ebenfalls reduziert und zeigten etwa dasselbe Niveau wie bei der Kultivierung in pH 4 und pH 7. Nach drei Stunden ergab sich ein etwas anderes Muster für die Keimungsraten unter den verschiedenen Bedingungen (**Abb. 28 B**). Die von 5,5 abweichenden pH-Werte führten für den Wildtyp und sCP2 zwar immer noch zu einer verringerten Keimungsrate, jedoch war der Unterschied zur Keimung bei pH 5,5 deutlich kleiner. Darüber hinaus konnte nach drei Stunden für pH 4 und pH 7 ein Unterschied zwischen Inkubation in Dunkelheit und Bestrahlung mit Grünlicht ermittelt werden. Nun war es auch bei diesen pH-Werten zu einer geringeren, grünlichtabhängigen Reduktion der Keimungsrate gekommen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass der pH-Wert der Umgebung und die Bestrahlung mit Grünlicht unabhängig voneinander unterschiedliche Stadien der Keimung beeinflussen.

Obwohl die Unterschiede zwischen den Keimungsraten bei den verschiedenen pH-Werten für sCP3 und sCP4 nur sehr klein und statistisch nicht signifikant waren, hatten sie sich nach drei Stunden, verglichen mit einer zweistündigen Inkubation angenähert. Somit waren für sCP3 und sCP4 kein Unterschiede zwischen den Keimungsraten bei verschiedenen pH-Werten oder Lichtbedingungen auszumachen.

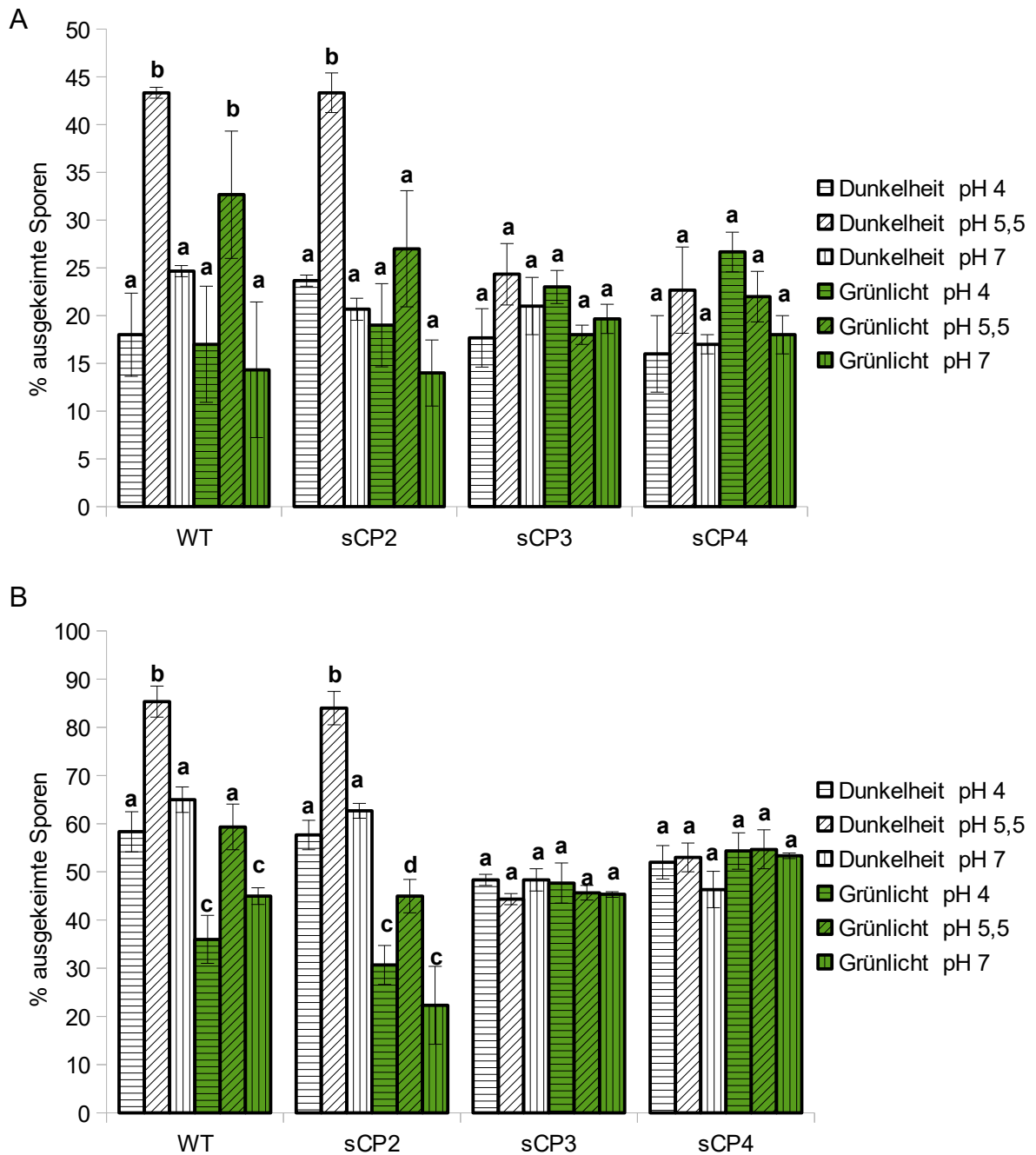


Abbildung 28: Untersuchung des Einflusses von pH auf die Keimung von WT, sCP2 ($\Delta opsA$), sCP3 ($\Delta opsB$) und sCP4 $\Delta opsA/\Delta opsB$). 20.000 Sporen des jeweiligen Stamms wurden in 400 μ l mCDB (1 % Glycerin statt 4 % Glukose) auf Deckgläschen in Dunkelheit oder mit Grünlichtbestrahlung bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Der pH 5,5 entspricht der gängigen Kulturbedingung für *A. alternata* und diente als Referenz. Die Bestimmung der Keimungsrate erfolgte lichtmikroskopisch nach 2 h (A) oder 3 h (B). Es wurden jeweils dreimal 100 Sporen gezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Für die statistische Analyse wurde eine ANOVA mit einem anschließenden Tukey HSD Test durchgeführt. Verschiedene Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) an.

3.8.3 Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A fördert die Keimung

Da eine Rolle von OpsB in der Keimung von *A. aternata* nachgewiesen werden konnte, sollte nun untersucht werden, wie das Signal von OpsB übermittelt wird. Dies sollte zunächst durch Zugabe von Chemikalien geschehen. Um hierbei möglichst direkt den potentiellen Effekt beobachten zu können, wurde zunächst die Keimung in einer Lösung ohne Nährstoffe untersucht. Um die Sporen und die frischen Keimschläuche keinem osmotischen Stress auszusetzen wurden Sporen vom Wildtyp sowie sCP2 sCP3 und sCP4 wie in **3.8.1** beschrieben in einer wässrigen Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) in Dunkelheit inkubiert. Dabei zeigte sich, dass nach zwei Stunden von den Stämmen sCP3 und sCP4 keine einzige Spore ausgekeimt war. Beim Wildtyp und sCP2 konnten ein paar wenige ausgekeimte Sporen (0 – 4 %) ausgemacht werden (**Abb. 29 A**). Nach drei Stunden konnten auch für sCP3 und sCP4 sehr wenige keimende Sporen (1 – 3 %) verzeichnet werden. Der Wildtyp hingegen zeigte trotz fehlender Kohlenstoffquelle oder einer anderen Form von Nährstoffen eine Keimungsrate von 27 % und sCP2 25%. Für *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass die Keimung vom Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat kontrolliert wird, indem dieser Botenstoff die Protein-Kinase A (PKA) aktiviert und so ein Signal entsteht, welches zur Keimung führt (Fillinger *et al.*, 2002). Um zu testen, ob das auch in *A. aternata* der Fall ist, wurde der 0,9 % NaCl-Lösung der künstliche PKA-Aktivator 8-Bromoadenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat (8-Br-cAMP) zugesetzt und die Keimungsraten bestimmt (**Abb. 29 A**). Durch die Zugabe des PKA-Aktivators konnte die Keimungsrate des Wildtyps nach zwei Stunden auf das 8,7-fache gesteigert werden und betrug 23,33 %. Für sCP2 wurde nach Zugabe von 8-Br-cAMP eine Keimungsrate von 21,67 % bestimmt, was einer 13-fachen Steigerung entspricht. Die Steigerung war in sCP3 von 0,33 % auf 3 % zwar geringer, aber dennoch vorhanden. Diese Beobachtung traf ebenfalls auf sCP4 zu. In diesem Stamm konnte die Keimungsrate von 0 % auf 2,33 % gesteigert werden. Nach drei Stunden konnte die Keimungsrate von Wildtypsporen durch 8-Br-cAMP weiter auf 55,67 % gesteigert werden und von Sporen des Stamms sCP2 auf 53 %. Nun konnte auch für sCP3 und sCP4 eine erhebliche Steigerung auf 35 % (sCP3) und 33 % (sCP4) ermittelt werden. Obwohl damit nicht eindeutig bewiesen wurde, dass OpsB die Keimung mittels cAMP und PKA Aktivierung fördert, wurde dieser Vermutung weiter nachgegangen. Die Steigerung des cAMP-Gehalts einer Zelle wird durch eine Adenylatzyklase bewerkstelligt, die von einem

G-Protein aktiviert wird, nachdem dieser vom C-Terminus eines aktivierten Rezeptors dissoziiert. Um zu testen, ob OpsB ebenfalls einen C-terminalen Interaktionspartner besitzt, der die Adenylatzyklase aktivieren könnte, wurde der Vektor pCP6, der ein Konstrukt trägt, das für OpsB mit C-terminal gekoppeltem GFP kodiert, mittels Protoplastentransformation eingebracht. Nach Identifizierung einer positiven Transformante, die nur in der Lage war, das modifizierte OpsB zu synthetisieren (sCP10), wurde untersucht, ob dieser Stamm in der Lage war den Phänotyp zu rekompimentieren (**Abb. 29 B**). Zusätzlich wurde aus sCP3 ein Stamm generiert, der mit dem unmodifizierten OpsB aus dem Genom des Wildtyps rekompimentiert wurde (sCP6). Die Rekompimentation von sCP3 mit dem natürlichen Gen *opsB* aus dem Wildtyp führte zu einer Steigerung der Keimungsrate auf das Niveau des Wildtyps (21,67 % nach drei Stunden Inkubation). Der neu generierte Stamm, der OpsB mit einem GFP am C-Terminus exprimiert, behielt die geringe Keimungsrate bei (2,33 nach drei Stunden Inkubation). Nun sollte die Keimungsrate von sCP10 in Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle (1 % Glycerin) und unter Bestrahlung mit Grünlicht bestimmt werden. Unter diesen Bedingungen wurde für sCP10 nach zwei Stunden eine Keimungsrate von 15 % in Dunkelheit und 16,33 % bei Bestrahlung mit Grünlicht ermittelt. Nach drei Stunden betrug die Keimungsrate 54 % in Dunkelheit und 43 % bei Inkubation in Grünlicht, was etwa dem Niveau von sCP3 entsprach.

Um zu testen, ob OpsB tatsächlich Einfluss auf den cAMP-Gehalt hat, wurde dieser mithilfe des cAMP Assay Kits (Competitive ELISA) von abcam gemessen. Hierfür wurden frische Sporen in flüssigem mCDB für 12 Stunden inkubiert. Das gewachsene Myzel wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Herstellerprotokoll weiterverarbeitet. Im Wildtyp wurden durchschnittlich 114,42 pmol cAMP/mg Protein und in sCP2 mit 116,24 pmol/mg etwa genauso viel cAMP gemessen. sCP3 hingegen besaß einen Gehalt von 59,11 und sCP4 57,92 pmol cAMP/ mg Protein.

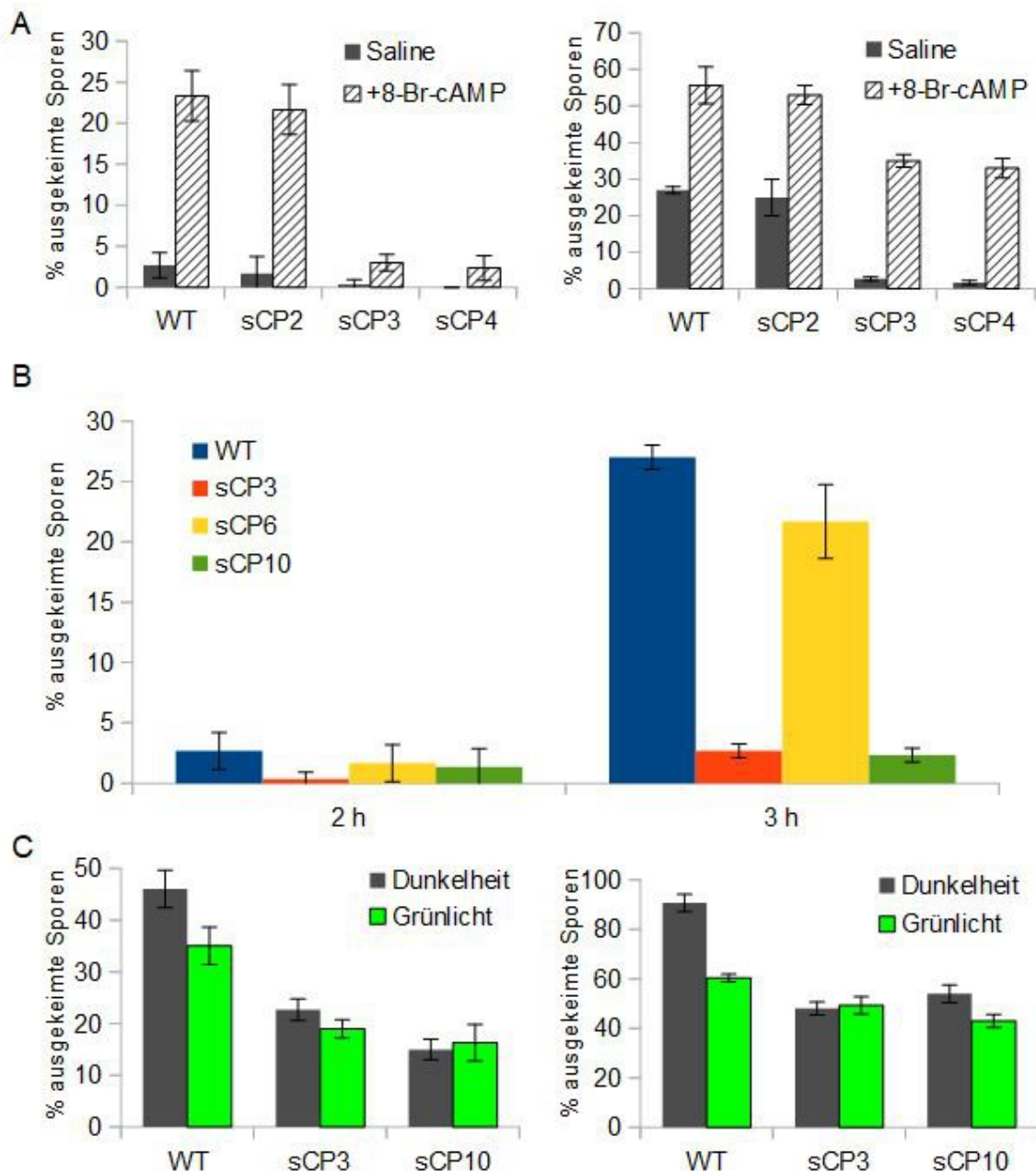


Abbildung 29: Der C-Terminus von OpsB ist essentiell für seine Funktion in der Sporenceimung. A: Durch Zugabe von 8-Br-cAMP, einem Aktivator der cAMP-abhängigen PKA, konnte die Keimungsrate von allen getesteten Stämmen in 0,9 % NaCl-Lösung erhöht werden. **B:** Durch Rekplementation des natürlichen OpsB-Gens im *opsB*-Deletionsstamm (sCP6), konnte die Keimungsrate wieder hergestellt werden. Durch Einbringung einer OpsB-Version mit GFP am C-Terminus (sCP10) konnte die Keimungsrate hingegen nicht rekomentiert werden. **C:** Auch bei Inkubation mit 1 % Glycerin als Kohlenstoffquelle und durch Bestrahlung mit Grünlicht wurde für sCP10 etwa die gleiche Keimungsrate wie bei sCP3 bestimmt, die jeweils deutlich geringer sind, als beim Wildtyp. Der Grünlichteffekt auf die Keimung konnte durch Einbringung der C-terminal *getaggt* OpsB-Version ebenfalls nicht wieder hergestellt werden. Es wurden jeweils dreimal 100 Sporen gezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.9 Die Inaktivierung beider Opsine in einem Stamm führt zu einer erhöhten Virulenz

Als bekannter Pflanzenpathogen ist *A. alternata* in der Lage verschiedene Pflanzen und ihre Früchte zu befallen. Durch den folgenden Verderb der Pflanzen und Früchte und die Kontamination durch Mykotoxine richtet *A. alternata* einen erheblichen ökonomischen Schaden an (Tsuge *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2015). Um die Auswirkung der Deletion der Opsine auf die Virulenz zu testen, wurden Tomaten mit den Stämmen infiziert. Da *A. alternata* ein opportunistischer Pathogen ist, wurden den Tomaten definierte Verletzungen zugefügt. Mit einem Skalpell wurde ein 1 cm langer Schlitz in die Haut der Tomaten geschnitten und jeweils 5000 Sporen des jeweiligen Stamms in sterilem Wasser auf die Verletzung pipettiert. Anschließend wurden die so präparierten Tomaten für eine Woche bei 25 °C und Grünlichtbestrahlung inkubiert. Anschließend wurden die Tomaten betrachtet und fotografiert (**Abb. 30**). Die Verletzungen auf den Tomaten waren von *A. alternata* bewachsen und um die Verletzungen hatten sich Läsionen gebildet. Zur genaueren Quantifizierung wurden diese genau vermessen. Das Ausmaß des Bewuchses unterschied sich in ihrer Größe unter den Stämmen nicht. Es war auffallend, dass sCP2 beim Befall der Tomate augenscheinlich weniger Luftmyzel bildete und so die Verletzung der Tomaten im Gegensatz zu den restlichen getesteten Stämmen nicht überwuchert wurden. Weiterhin zeigte sich, dass der Stamm sCP4 im Durchschnitt größere Läsionen bildete als die anderen getesteten Stämme. Für sCP2 konnte eine minimale Reduzierung der Läsionslänge gemessen werden.

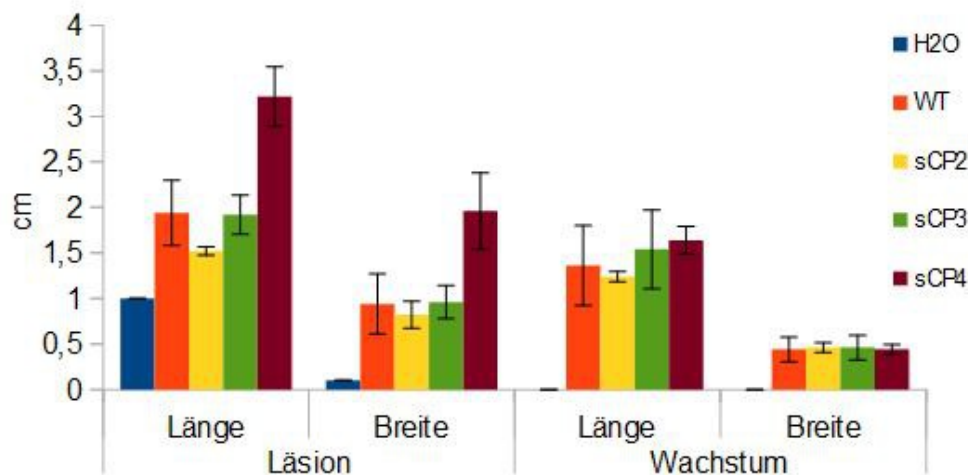


Abbildung 30: Untersuchung der Virulenz der Opsin-Deletionsstämmen. Um den Einfluss der Gene *opsA* und *opsB* auf die Virulenz von *A. alternata* zu untersuchen, wurden Tomaten mit Sporensuspensionen infiziert. Hierfür wurde den Tomaten mit einem Skalpell 1 cm große Schnittwunden zugefügt und auf diese jeweils 5000 Sporen gegeben. Die Tomaten wurden für eine Woche bei 25 °C und mit Grünlichtbestrahlung inkubiert. Anschließend wurden die augenscheinlich bewachsenen Flächen und die entstandenen Läsionen in Länge und Breite vermessen. (sCP2: $\Delta opsA$; sCP3: $\Delta opsB$; sCP4: $\Delta opsA/\Delta opsB$)

3.10 OpsA und OpsB führen in *A. nidulans* zur Produktion von Kleistothezien

Da der filamentöse Pilz *A. nidulans* nur ein Opsin besitzt, welches nicht das kritische Lysin zur Chromophorbinding hat, sollten OpsA und OpsB aus *A. alternata* in diesem Organismus heterolog exprimiert werden. Hierfür wurden die Vektoren pCP7, der *opsA* unter Kontrolle des natürlichen Promotors von *opsA* trägt sowie pCP8, der *opsB* unter Kontrolle des natürlichen Promotors von *opsB* trägt, mittels Protoplastentransformation in den Uracil/Uridin und Pyridoxin auxotrophen *A. nidulans* Stamm sKV103 eingebracht. Die Selektion erfolgte anhand der Uracil/Uridin Auxotrophie und die Integration wurde mittels PCR nachgewiesen. Nachdem für jedes Opsin drei Transformanten identifiziert wurden,

die das jeweilige Gen in das Genom integriert hatten und den gleichen Phänotyp zeigten, wurden sie mit sKV103 verglichen. Hierfür wurden die Stämme einmal zusammen auf einer Minimal Medium (MM)-Agarplatte (+ 0,1 mg/l Pyridoxin) bei 37 °C in Dunkelheit und mit Grünlichtbestrahlung inkubiert und einmal auf supplementierten MM-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C in Dunkelheit oder mit Weißlichtbestrahlung inkubiert (**Abb. 31**). Der Stamm, der *opsA* exprimiert, bildete keine asexuellen Konidiosporen mehr, dafür viele sexuelle Kleistothezien. Der *opsB*-exprimierende Stamm war ebenfalls nicht mehr in der Lage Konidiosporen zu bilden, bildete aber im Vergleich zum *OpsA*-exprimierenden Stamm weniger Kleistothezien. Die Bestrahlung mit Licht zeigte keine große Wirkung. Aufgrund der nicht vorhandenen Konidiosporenproduktion war es nicht möglich, eine definierte Sporenmenge der Stämme auszuplattieren und sie so quantitativ zu analysieren.

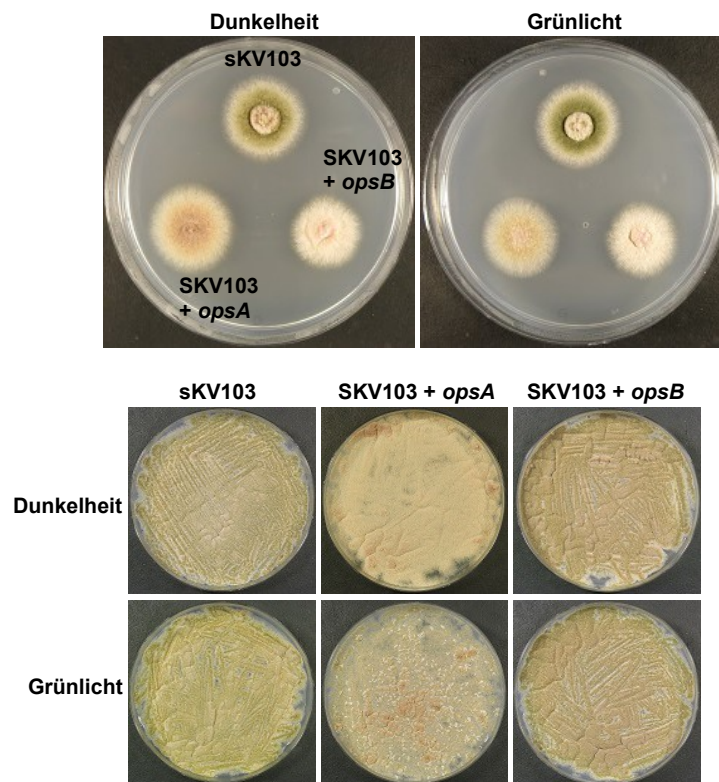


Abbildung 31: Heterologe Expression von *opsA* und *opsB* in *A. nidulans*. Die Opsin-Gene aus *A. alternata opsA* und *opsB* wurden unter Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren in *A. nidulans* eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden in Dunkelheit in Dauerbestrahlung mit Licht inkubiert und waren nicht mehr in der Lage asexuelle Konidiosporen zu produzieren. Die Bildung von sexuellen Kleistothezien war hingegen augenscheinlich erhöht.

4. Diskussion

4.1 Die Verteilung und Rolle von Opsinen ist nicht konserviert

Opsine kommen in verschiedenen Organismen, von Archaeen und Bakterien über Algen und Pilzen bis hin zu Tieren vor. Generell sind die in Pilzen vorkommenden Opsine in Sachen Aminosäuresequenz denen aus Archaeen recht ähnlich. Ihre Verteilung innerhalb des Reichs der Pilze ist erstaunlich divers und reicht von Pilzen mit lediglich einem bis hin zu sieben Opsinen (Brown, 2004). Verwunderlich ist auch, dass viele Pilze eine Opsin-Version besitzen, in der das Lysin zur Chromophorbindung nicht vorhanden ist, was die Rolle als Grünlichtrezeptoren fragwürdig macht (Bieszke *et al.*, 1999). Ebenso divers wie ihre Verteilung sind Funktionen, die ihnen zugeschrieben wurden. In *Allomyces (Chytridiomycota)* wurde Rhodopsin als Rezeptor zur Phototaxis von Zoosporen erkannt (Saranak & Forster, 1997). In *S. cerevisiae* wurden Opsine als Hitzeschock-Proteine identifiziert (Panaretou & Piper, 1992; Regnacq & Boucherie, 1993), in *N. crassa* wurde ihnen eine Rolle beim Eintritt in den sexuellen Zyklus zugeschrieben (Wang *et al.*, 2018), in *F. fujikuroi* scheinen sie eine Rolle in der Virulenz zu spielen (Adam *et al.*, 2018) und in *S. sclerotina* sind sie essentiell für das Wachstum und Sklerotienbildung (Lyu *et al.*, 2015). Die Suche nach der Funktion einzelner Opsine gleicht also der Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Diese Diversität von Opsinen macht es auch schwierig die Auswirkung von heterolog exprimierten Opsinen zu interpretieren. In dieser Arbeit wurden die Opsine OpsA und OpsB heterolog in *A. nidulans* exprimiert, der selbst nur für ein Opsin kodiert, das nicht in der Lage sein sollte den Retinalchromophor zu binden. Das führte zu einer reduzierten asexuellen und vermehrten sexuellen Sporenbildung. Das kann einerseits für eine heterologe Rolle im sexuellen Zyklus wie in *N. crassa* interpretiert werden, andererseits als einfache Stressantwort.

Die ungleiche Verteilung von Opsinen könnte darauf hinweisen, dass sie jeweils unterschiedliche Rollen im Organismus haben. Eine weitere Erklärung ist, dass mehrere verschiedene Opsine in einem Organismus ähnliche Funktionen haben, aber unterschiedliche spektrale Bereiche oder Intensitäten wahrnehmen (Sineshchekov *et al.*, 2002). Manche Opsine sind sozusagen eine Reserve, die nur unter Stressbedingungen exprimiert wird. Weiterhin könnte die rätselhafte Verteilung von Opsinen die Konsequenz von Genom oder Gen Duplikationen sein, wie sie in einigen Hefespezies gezeigt wurden (Seoighe & Wolfe, 1999; Wong *et al.*, 2002). In *A. alternata* hatten die Einzeldelationen der Opsine keine Auswirkung auf die Virulenz gegenüber Tomaten. Die Doppeldeletion

hingegen zeigte eine erhöhte Virulenz, was suggeriert, dass OpsA und OpsB in dieser Hinsicht den gleichen negativen Effekt auf die Virulenz haben und die Abwesenheit des jeweils anderen Opsins kompensieren können. Diese Beziehung von OpsA und OpsB für ihre Funktionen in *A. alternata* zu verallgemeinern steht jedoch gegenüber, dass OpsA und OpsB an unterschiedlichen Membranen lokalisieren und suggeriert, dass sie unterschiedliche Funktionen haben. Weiterhin wurde beobachtet, dass in den meisten Untersuchungen von Opsin-defekten Stämmen der Doppeldeletionsstamm ähnliche Ergebnisse lieferte wie die Einzeldelation von *opsB*, was suggeriert, dass OpsB dominant über OpsA ist. Jedoch wurde durch Expressionsanalysen gezeigt, dass *opsA* und *opsB* sich gegenseitig negativ regulieren, was die jeweiligen Proteine wieder in Bezug zueinander stellt.

4.2 OpsA lokalisiert an der Vakuolenmembran

Pilzliche Vakuolen besitzen, ähnlich wie Lysosome von Säugetieren, einen sauren pH und beinhalten eine Vielfalt an hydrolytischen Enzymen (Achstetter & Wolf, 1985; Jones, 1984; Kornfeld & Mellman, 1989). Obwohl der Abbau von Makromolekülen eine eindeutig zugewiesene Funktion der pilzlichen Vakuole ist, ist sie noch an vielerlei weiterer zellulärer Prozesse beteiligt. Beispielsweise ist sie wichtig bei der Lagerung von Metaboliten sowie dem Haushalten von Ionen und dem pH im Zytoplasma (Anraku *et al.*, 1989; Davis, 1986) und ist in dieser Hinsicht der pflanzlichen Vakuole ähnlicher (Matile, 1978). So ist es nicht verwunderlich, dass eins der beiden Opsine aus *A. alternata*, OpsA, an der Vakuolenmembran lokalisiert, da OpsA als Protonenpumpe eine wichtige Funktion in der Rolle der Vakuole als Gewährleister des Ionen und pH Haushalts der Zelle spielen könnte. Für verschiedene Homologe zu OpsA wurden Untersuchungen von *knock-out* Stämmen durchgeführt aber keine Lokalisierungen vorgenommen. Dabei wurde immer wieder beobachtet, dass die Auswirkungen der Inaktivierung des entsprechenden Gens keine oder zumindest nur schwer erkennbare oder sehr verschiedene Phänotypen hervorruft (Prado *et al.*, 2004). Das lässt sich dadurch erklären, dass verschiedene OpsA Homologe nicht an der Vakuole lokalisieren oder aber auch durch den Fund, dass die Funktionen von Vakuolen in Pilzen nicht konserviert sind und an verschiedene Bedürfnisse des Pilzes in Bezug auf seine Nische angepasst sind (Veses *et al.*, 2008). Zum Beispiel konnte eine veränderte Vakuolen Morphologie und Physiologie mit der Einschränkung des Wachstums sowie der Virulenz von Human Pathogenen (wie *Candida albicans*) und

Pflanzenpathogenen (wie *Ustilago maydis* und *Magnaporthe grisea*) in Verbindung gebracht werden (Veses *et al.*, 2008; Steinberg *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2001). Im Vergleich zum neutralen Zytosol ist der pH der Vakuole sauer (Preston *et al.*, 1989; Yamashiro *et al.*, 1990; Plant *et al.*, 1999; Martínez-Muñoz & Kane, 2008). Das liegt hauptsächlich am aktiven Protonentransport vom Zytosol in die Vakuole durch die H⁺-ATPase im Vakuolenlumen (Kane, 2006). Viele Funktionen der Vakuole sind von diesem sauren pH abhängig. Das beinhaltet Membranenzyme (Yamashiro *et al.*, 1990), das effiziente Aussortieren von löslichen Proteinen (Klionsky *et al.*, 1992a, b), Transport von Ionen und Metaboliten an der Vakuolenmembran (Ohsumi & Anraku, 1981; Booth & Guidotti, 1997; MacDiarmid *et al.*, 2002; Poltermann *et al.*, 2005) sowie Teilung und Fusion von Vakuolen (Peters *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 2003; Baars *et al.*, 2007). In *N. crassa* konnte ein Phänotyp des Opsin-*knock-outs* durch Zugabe von Oligomycin, ein Inhibitor von vakuolären H⁺-ATPasen ausgemacht werden (Bieszke *et al.*, 1999a), was für eine funktionelle Überschneidung des Opsins und der V-ATPase spricht. In *A. alternata* konnte durch Zugabe von Oligomycin jedoch keine Veränderung in sCP2 ($\Delta opsA$) beobachtet werden. Dennoch wurde bei sCP2 eine starke Veränderung im pH Haushalt beobachtet, was, zusammen mit dem eingeschränkten Koloniewachstum von sCP2, für die große Wichtigkeit von OpsA für die uneingeschränkte Funktionsfähigkeit der Vakuole spricht. Zudem ist das möglicherweise auch die Verbindung von OpsA zu dem Blaulichtrezeptor WC-1. WC-1 kann zusammen mit WC-2 direkt als Transkriptionsfaktor fungieren und in *N. crassa* konnte gezeigt werden, dass WC-1 ebenfalls eine wichtige Rolle im Ionen Haushalt sowie der elektrophysiologischen Eigenschaften der Membran spielt (Potapova *et al.*, 1988, Levina *et al.*, 2002). In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass sein Homolog UmOps2 ebenfalls an der Vakuolenmembran lokalisiert und seine Expression von WC-1 abhängig ist (Panzer *et al.*, 2019). So ist es eindeutig, dass eine Verbindung zwischen OpsA und WC-1 besteht. Eine mögliche Folgerung ist, dass OpsA in seiner Funktion indirekt WC-1 beeinflusst, so die Signaltransduktion in den Zellkern modifiziert und es über diesen Weg auf transkriptioneller Ebene fungiert. Ein UmOps2 *knock-out* Stamm wurde jedoch nicht charakterisiert.

4.3 Das zytoplasmamembranständige OpsB beeinflusst die Keimung der Sporen

Im Gegensatz zu OpsA lokalisiert OpsB an der Zytoplasmamembran. Da in den Sporen ein wesentlich stärkeres Signal als in Hyphen beobachtet wurde und das Konstrukt zur Lokalisierung unter Kontrolle des natürlichen *opsB* Promotors stand, wurde hier zumindest eine der Funktionen von OpsB in Sporen vermutet. Die Aktivität von OpsB könnte den internen und externen pH verändern und so die Entwicklung von, vor allem jungen, Hyphen beeinflussen. Der Einfluss von Protonengradienten auf Zellpolarität und das Wachstum der Hyphenspitze wurde bereits untersucht (Turian, 1993; Robson, 1996; Jelitto 1999). In *Penicillium expansum* wurde gezeigt, dass der pH Wert die Keimungsrate und Länge der Keimschläuche beeinflusst (Li *et al.*, 2010) und in *F. fujikuroi* konnte für das Opsin CarO eine reprimierende Wirkung auf die Keimung gezeigt werden (Garcia-Martinez *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte für OpsB auch ein eindeutiger Einfluss auf die Keimungsrate gezeigt werden. Allerdings war diese im Gegensatz zu CarO nicht reprimierend, sondern induzierend, da die Deletion von *opsB* zu einer geringeren Keimungsrate führte. Überraschend war auch, dass der Effekt von OpsB auf die Keimung nicht, oder zumindest nicht ausschließlich, von einer Lichtquelle abhängt. Im Wildtyp konnte die Keimungsrate durch Bestrahlung mit Grünlicht zwar um 11 % nach zwei Stunden, beziehungsweise 30 % nach drei Stunden, gesenkt werden, jedoch resultierte die Deletion von *opsB* in einer weiteren Reduzierung der Keimungsrate und nicht in der Wiederherstellung der Keimungsrate des Wildtyps in Dunkelheit. Dennoch führte die Bestrahlung mit Grünlicht in sCP3 ($\Delta opsB$) Sporen nicht zu einer weiteren Reduzierung der Keimungsrate. Obwohl OpsB eine funktionelle grünlichtabhängige Protonenpumpe ist, heißt das nicht, dass seine Funktion zwangsläufig auf dieser Protonenpumpaktivität beruht. Die vielen beobachteten Effekte der Deletionsmutanten in Dunkelheit und die mögliche Interaktion der Signalwege der Blau- und Rotlichtrezeptoren unterstreichen das. Viel wahrscheinlicher ist, dass ein von OpsB ausgehendes Signal ausschließlich oder zusätzlich über Transducer oder andere Membranproteine erfolgt, wie es bereits in der Literatur für Opsine vermutet wurde (Fan *et al.*, 2011). Ein möglicher Signalweg, in dem OpsB eine Rolle spielen konnte, war der cAMP-PKA Signalweg. Der Botenstoff cAMP ist an vielen Funktionen in Pilzzellen beteiligt (Cohen, 1974; Pall, 1981). So wird ihm beispielsweise eine Rolle bei der Verästung von Hyphen, dem Wachstum an Hyphenspitzen und der Keimung von Sporen zugeschrieben, in dem es bestimmte

Proteine oder Protein Kinasen phosphoryliert. In *F. graminearum* und *N. crassa* wurde beobachtet, dass ein hohes cAMP Level zu einer geringeren Hyphenverlängerungsrate führt (Robson, Wiebe & Trinci, 1991; Murayama *et al.*, 1985). Diese Beobachtung ist eine mögliche Erklärung für das leicht vergrößerte Kolonienwachstum der Stämme sCP3 und sCP4 und verweist auf den Effekt von OpsB auf die gebildete cAMP Menge. In Bezug auf die Keimung von Sporen wurden für cAMP unterschiedliche Beobachtungen gemacht. In *Sordaria macrospora* wurde eine negative Wirkung von cAMP auf die Keimung von Askosporen entdeckt (Dirschnabel *et al.*, 2014), wohingegen in *B. emersonii* und *A. nidulans* eine positive Wirkung von cAMP auf die Keimung von Sporen gefunden wurde (Maia *et al.*, 1979; Fillinger *et al.*, 2002). In **3.8.3** konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 8-Br-cAMP, einem Aktivator der cAMP-abhängigen PKA, zu einer Steigerung der Keimungsrate führt. Durch Messung des cAMP-Gehalts mit einem ELISA basierten cAMP Assay Kit konnte der direkte Einfluss von OpsB auf die Menge an vorhandenem cAMP ermittelt werden. Fillinger *et al.* schrieben 2002 von einer cAMP-PKA-unabhängigen Induktion der Keimung von *A. nidulans* Sporen durch die Ras GTPase RasA. Die Signalwege in Pilzen sind relativ hoch konserviert (Rispaill *et al.*, 2009) und das Genom von *A. alternata* besitzt ebenfalls ein Homolog zu RasA. Auch wenn die mögliche Interaktion von OpsB mit dem *A. alternata* Homolog zu RasA nicht nachgewiesen werden konnte, ist sie dennoch nicht auszuschließen. Eine Interaktion von Ras-Homologen mit der MAPKK Kinase MEKK1 ist aus der Literatur bekannt (Russel *et al.*, 1995) und in *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass das MEKK1 Hefe-Homolog Ste11p mit dem HOG-Signalweg interagiert (Wang *et al.*, 2011). Diese Verbindung zum HOG-Signalweg würde die OpsB- und grünlichtabhängige Phosphorylierung von HogA, die in **3.8** beobachtet wurde, simpel erklären.

4.4 Phosphorylierung von HogA durch Grünlicht

Der HogA Signalweg ist den stressaktivierten Protein Kinase Signalwege aus *S. cerevisiae*, *A. nidulans* und anderen filamentösen Pilzen sehr ähnlich (Brewster *et al.*, 1993; Han & Prade, 2002; Kawasaki *et al.*, 2002; Lara-Rojas *et al.*, 2011; Fischer *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Garrido-Bazan *et al.*, 2018; Rispaill *et al.*, 2009; Manfiolli *et al.*, 2019, Igbalajobi *et al.*, 2019). HogA Orthologe spielen eine Rolle in der osmotischen und oxidativen Stressantwort, in der Reaktion auf Zellwand schädigende Stoffe, Verletzungen, der sexuellen und asexuellen Entwicklung, der Reaktion auf Fungizide sowie der

Photogenität (Eaton *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2012; Lamb *et al.*, 2012; Van Nguyen *et al.*, 2013; Nimmanee *et al.*, 2015). Diese Signalwege werden durch die Phosphorylierung konservierter Threonin und Tyrosin Reste in der katalytischen Domäne aktiviert, wodurch die entsprechenden Enzyme wiederum verschiedene weitere Substrate phosphorylieren und so diverse biologische Prozesse regulieren (Ferrigno *et al.*, 1998; Day & Quinn, 2019). Allgemein ist Licht ein Stresssignal und reguliert beispielsweise die Reparatur von DNA Schäden durch Photolyasen, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Transkription von Genen, die für Chaperone kodieren oder an der Produktion von Sekundärmetaboliten beteiligt sind (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; Fuller *et al.*, 2015). In *A. alternata* ist die Phosphorylierung von HogA durch Blau- und Rotlicht gezeigt worden (Igbalajobi *et al.*, 2019). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Bestrahlung mit Grünlicht für 5 Minuten in der Lage ist den Transport von phosphoryliertem HogA in den Zellkern hervorzurufen. Im *opsB*-Deletionsstamm sCP3 und im Doppeldeletionsstamm sCP4 konnte kein Transport von phosphoryliertem HogA in den Zellkern und keine Anreicherung von phosphoryliertem HogA nach Bestrahlung mit Grünlicht beobachtet werden. Das zeigt, dass OpsB maßgeblich an der Stressantwort auf Grünlicht beteiligt ist. Obwohl sCP2 ($\Delta opsA$) nach Grünlichtbestrahlung ein erhöhtes Signal von phosphoryliertem HogA im Zytoplasma zeigte und die Tendenz, dass dieses in den Zellkernen akkumuliert, erkennbar war, so war die Akkumulation im Zellkern weniger stark ausgeprägt als im Wildtyp. Die grünlichtabhängige Phosphorylierung von HogA scheint also auch ohne OpsA stattzufinden, jedoch etwas langsamer oder schwächer. Da schon eine gegenseitige Beeinflussung von OpsA und WC-1 vermutet wurde und die Aktivierung von HogA durch Blaulicht von WC-1 abhängig ist, scheint das die indirekte Interaktion von OpsA mit WC-1 weiter zu bestätigen. Die Wellenlängen von Blaulicht und Grünlicht liegen dicht beieinander und die Untersuchung des Aktionsspektrums von CarO aus *F. fujikuroi* zeigte auch eine Glockenkurve, die bei etwa 525 nm ihr Maximum hat, aber das Opsin auch bei anderen Wellenlängen aktiv ist (Garcia-Martinez *et al.*, 2015). Es ist also anzunehmen, dass sich die Wahrnehmung von Lichtqualitäten der verschiedenen Photorezeptoren überschneiden.

4.5 Beide Opsine beeinflussen die Sporulation

Durch die Bildung von Sporen sind Pilze in der Lage Umwelteinflüssen zu trotzen und entlegene Habitate zu besiedeln. Licht ist eines von vielen Signalen, das die Sporulation filamentöser Pilze beeinflusst. In *A. nidulans* regt Rotlicht und Blaulicht die Bildung von asexuellen Konidiosporen an, wohingegen die Bildung von sexuellen Sporen unterdrückt wird (Blumenstein *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2008). Interessanterweise haben Rotlicht und Blaulicht keine Auswirkung auf die asexuelle Entwicklung des nahen Verwandten *A. fumigatus* (Fuller *et al.*, 2003). Auf molekularer Ebene reagiert *brlA*, von dem angenommen wird die zentrale Rolle in der Bildung asexueller Sporen zu tragen, auf Licht und die Expression ist abhängig vom sogenannten Photorezeptor Komplex, der sich aus Phytochrom FphA, den White Collar Homologen LreA und LreB sowie den *fluffy* Genen *flbA-C* (Ruger-Herreros *et al.*, 2011) zusammensetzt. In *B. cinerea* scheint die Bildung asexueller Sporen hauptsächlich vom WC-1 Homolog Bcwcl1 abhängig zu sein. Die Deletion des entsprechenden Gens resultierte in einer frühen und dauerhaften Produktion asexueller Sporen bei verschiedenen Lichtqualitäten (Canessa *et al.*, 2013). In *T. atroviride* induziert Blaulicht die Produktion asexueller Sporen und die Deletion der Blaulichtrezeptorgene *blr1* und *blr2* führte zum Verlust der Konidiosporenbildung in Licht (Casas-Flores *et al.*, 2004; Castellanos *et al.*, 2010). In *F. graminearum* wird die sexuelle Entwicklung ebenfalls von den entsprechenden WC Homologen negativ reguliert (Kim *et al.*, 2015), jedoch resultierte die Deletion des Phytochroms in keinerlei morphologischer Veränderung, wie es auch bei *N. crassa* und *C. neoformans* der Fall ist (Idnurm & Heitman, 2005; Froehlich *et al.*, 2005). In *N. crassa* moduliert das Opsin Nop-1 die sexuelle Entwicklung. Die Deletion von *nop-1* resultierte in einem frühen Eintritt in die sexuelle Entwicklung auf nicht versiegelten Platten bei dauerhafter Blau- und Weißlichtbestrahlung (Wang *et al.*, 2018). Da *A. alternata* keinen sichtbaren sexuellen Zyklus besitzt, können hier nur die asexuellen Sporen betrachtet werden. Hier konnte eine erhöhte Sporenproduktion in Rotlicht beobachtet und gemessen werden. Blau- und Grünlicht hemmte die Sporenbildung. *A. alternata* verhält sich also in Bezug auf die Sporenbildung anders als *A. nidulans*, in dem Blaulicht die Sporenbildung erhöht. Die Deletionen des Phytochroms und des WC-1 Homologs resultierten beide in reduzierter Sporenbildung, sowohl in Dunkelheit als auch in Rotlicht. Für Grün- und Blaulicht konnte kein wesentlicher Unterschied beobachtet werden, da schon der Wildtyp unter diesen Bedingungen nahezu keine Sporen mehr produziert (Igbalajobi *et al.*, 2016). Nun konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Deletion von *opsA* keine

Auswirkung auf die Sporulation in Dunkelheit hatte, die Deletion von *opsB* jedoch zu einer reduzierten Produktion von Sporen führte. Unter Rotlicht führte sowohl die Deletion von *opsA* als auch von *opsB* zu einer Reduktion der Sporenbildung, was wieder einen Hinweis auf ein Zusammenspiel sämtlicher Lichtrezeptoren in *A. Alternata* gibt.

4.6 *A. alternata* verändert den pH seiner Umgebung. Aushängeschild seiner Virulenz?

Das Phänomen, dass Pilze den pH ihrer Umgebung verändern, wird im Wesentlichen auf zwei Ursachen zurückgeführt. Die erste Ursache ist der Metabolismus. Wächst *S. cerevisiae* auf einem glukosereichen Medium, wechseln die Zellen rasch zu einem fermentativen Wachstum, wobei sie durch die Glykolyse Ethanol, CO₂ und organische Säuren produzieren (Johnston, 1999; Conrad *et al.*, 2014). Dadurch säuern die Zellen ihre Umgebung schnell an und zum Erhalt aller Zellfunktionen ist ein verlässlicher Mechanismus zur regulation des zellinneren pH erforderlich (Orij *et al.*, 2011). Zum anderen ist die aktive Beeinflussung des umgebenden pH Teil der Virulenz von pathogenen Pilzen. Beim Befall eines Wirts produzieren Pilze ein ganzes Set an extrazellulären Enzymen. Durch Studien an vielen Mutanten wurde geschlussfolgert, dass einzelne Enzyme, wenn überhaupt, nur teilweise eine Rolle bei der Pathogenität spielen (Annis & Goodwin 1997; Kim *et al.*, 2001; Scott-Craig *et al.*, 1998; Walton, 1994). Der Avocado-Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* produziert während der Kolonisierung der infizierten Pflanze Pektin-abbauende Enzyme wie Polygalacturonase (Prusky *et al.*, 1989; Yakoby *et al.*, 2000b), Pektin Lyase A (Bowen *et al.*, 1995; Templeton *et al.*, 1994), Pektin Methylesterase (Ortega, 1996) und Pektat Lyase B (Wattad *et al.*, 1997). Von diesen Enzymen hatte jedoch nur Pektat Lyase B einen direkten Effekt auf die Virulenz, wie durch heterologe Expression in *C. magna* und die Inaktivierung in *C. gloeosporioides* gezeigt werden konnte (Yakoby *et al.*, 2000a; Yakoby *et al.*, 2001). In vielen anderen Fällen zeigte die Deletion einzelner Gene oder Kombinationen mehrerer keine Auswirkung auf die Virulenz. Beispiele hierfür sind Deletionen von Genen der Polygalacturonase in *F. oxysporum* (Garcia-Maceira *et al.*, 2000), Pektat Lyase PL-B in *Nectria haematococca* (Gou *et al.*, 1995), zweier Xylanasen in *M. grisea* (Sheng-Cheng *et al.*, 1997), zweier Polygalacturonasen in *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig *et al.*, 1990, 1998) und der Endopolygalacturonase in *Cryphonectria parasitica* (Gao *et al.*, 1996). In *B. cinerea* hingegen führte die Deletion des Endoploygalacturonase Gens zu einer reduzierten

Läsionsentwicklung (ten Have *et al.*, 1998). Der pH ist ein wichtiger Faktor beim Befall eines Wirts. Viele Enzyme und Produkte werden nur bei einem pH gebildet, bei dem sie auch effizient funktionieren. Der pH reguliert also die Produktion und Sekretion von Enzymen und Metaboliten, die extrazellulär arbeiten (Denison, 2000). Die Endoglucanase Aak1 aus *A. alternaria* zeigte höchste Expression bei pH-Werten > 6 (Eshel *et al.*, 2002b). In Bezug auf den pH werden pathogene Pilze in zwei Gruppen eingeteilt: Azidifizierer senken den pH und Alkalisierer erhöhen den pH, um ihre Virulenz zu verstärken (Prusky & Yakoby, 2003). In beiden Fällen werden vom Pilz Pathogenitätsfaktoren sekretiert (Eshel *et al.*, 2002a; Prusky *et al.*, 2001; Rollins, 2003; Yakoby *et al.*, 2000a). Bateman & Beer (1965) waren die ersten, die pH und Pathogenität in Verbindung setzten. Laut ihnen geschah die Ansäuerung des Wirtsgewebes um den pH des apoplastischen Raums anzupassen, sodass der enzymatische Abbau der Pflanzenzellwand effizienter ist. Die Ansäuerung des Gewebes wurde für *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. cinerea* und *S. sclerotium* berichtet (Prusky *et al.*, 2003; (Bateman & Beer, 1965; Rollins & Dickman, 2001; Vautard-Mey & Fevre, 2003). Interessanterweise führte in *S. sclerotium* die Deletion des Opsins zu einer verringerten Virulenz. Die Ansäuerung des Gewebes wird verstärkt durch die Akkumulation organischer Säuren und/oder die Exkretion von Protonen. *S. sclerotium* und *B. cinerea* senken den pH des Wirts durch die Sekretion großer Mengen an Oxalsäure (Manteau *et al.*, 2003; Rollins & Dickman, 2001), wohingegen *Penicillium* und *Aspergillus* Arten hauptsächlich Gluconsäure und Zitronensäure sekretieren (Ruijter *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass die Alkalisierung durch pathogene Pilze durch die Sekretion von Ammonium erreicht wird (Prusky & Yakoby, 2003). Die Produktion von Ammonium scheint die Folge von Protease Aktivierung und anschließender Deaminierung von Aminosäuren zu sein (Jennings, 1989). Die Pathogenität und die Expression des sekretierten Virulenzfaktors PL-B in *C. gloeosporioides* sind beide von der Erhöhung des pH abhängig. Hier wurde auch beobachtet, dass die Akkumulation von Pektatlyase *in vitro* mit einer Erhöhung des pH des Mediums von 3,8 auf 7 einhergeht. Weiterhin werden Avocados auf natürliche Weise anfällig für den Befall von Pilzen, da sich der pH ihrer Fruchtwand während des Reifungsprozesses erhöht (Yakoby *et al.*, 2000b; 2001). Dieser Prozess wird durch die Sekretion von Ammonium durch den Pilz beschleunigt und weiter erhöht, sodass das Optimum für die Sekretion von PL-B erreicht wird (Wattad *et al.*, 1997). In *C. coccodes* und *C. acutatum* konnte ebenfalls eine Erhöhung des pH und die Akkumulation von Ammonium während der Besiedlung ihres Wirts gemessen werden (Prusky *et al.*, 2001). Im Fall von *A. alternata* wurde die Erhöhung des pH und die

Akkumulation von Ammonium auf verschiedenen Früchten gemessen: Tomaten, Paprika, Melonen, Kirschen und Kaki. Interessanterweise korrelieren Erhöhung des pH und Akkumulation von Ammonium beim Befall durch *A. alternata* nicht. Die Sekretion von Ammonium von Pilzen ist ebenfalls für *N. crassa*, *A. fumigatus*, *C. albicans* und *Metarhizium anisopliae* bekannt (De Bernardis *et al.*, 1998; Sikora & Marzluf., 1982; St Leger *et al.*, 1997, 1998, 1999). *A. alternata* zählt also zu den Alkalisierern. Obwohl er eine basische Umgebung bevorzugt (**3.7.1**), ist er trotzdem in der Lage Früchte mit stark abweichenden pH-Werten, wie Zitronen (pH 3 – 3,5) und Kaki (pH 5,8 – 6) effektiv zu befallen. Das mag, zumindest teilweise, an seiner in dieser Arbeit demonstrierten Fähigkeit liegen, seine Umgebung zu alkalisieren. Zudem kann aufgrund des hohen Wirtsspektrums angenommen werden, dass *A. alternata* verschiedenste Enzyme und Metabolite produzieren kann, die unter verschiedenen Bedingungen, beziehungsweise auf verschiedenen Wirten, zum Einsatz kommen. In sCP2 wurde eine verlängerte initiale Ansäuerungsphase beobachtet sowie eine kleine Verringerung der Läsionslänge auf Tomaten. Hier ist ein Zusammenhang denkbar. Da der Stamm dennoch in der Lage war, Tomaten effektiv zu befallen, kann angenommen werden, dass er im Vergleich zum Wildtyp andere Virulenzfaktoren gebildet hat. Obwohl der Unterschied in der Virulenz bei einzeln deletierten Opsinen nicht sehr groß oder nicht vorhanden war, führte die Deletion beider Opsine in einem Stamm zu einer deutlichen Vergrößerung der Läsionen. Eine negative Regulation der Virulenz im Zusammenspiel beider intakter Opsine ist keineswegs abwegig, denn die zu radikale Zersetzung des Gewebes und etwaige Tötung des Wirtsorganismus ist ein denkbarer Nachteil für den Pilz. In *F. iujikuroi* führte die Deletion des einen Opsins CarO ebenfalls zu einer stärkeren Virulenz, wohingegen die Deletion des anderen, OpsA, keine Auswirkung auf die Virulenz hatte (Adam *et al.*, 2018). Die Untersuchung eines Stamms, der keines der beiden Opsine mehr exprimieren kann, wurde nicht vorgenommen. Die initiale Ansäuerung wurde auch beim Wildtyp beobachtet. Für manche Pilze, wie *F. Fujikuroi*, ist bekannt, dass ein niedriger pH die Keimung der Sporen fördert (Garcia-Martinez *et al.*, 2015). In *A. alternata* ist das nicht der Fall, wie in **3.8.2** gezeigt werden konnte. Es ist wahrscheinlicher, dass die initiale Ansäuerung eine Begleiterscheinung des Metabolismus ist. Nachdem die Verfügbarkeit an Zucker im Medium gesunken ist, könnte *A. alternata* sich durch die Alkalisierung der Umgebung bereits auf den Befall einer Pflanze oder die Zersetzung schwer zugänglicher Nährstoffquellen vorbereiten.

4.7 Modell zur Signalweiterleitung von OpsA und OpsB

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein Modell zur Signalweiterleitung von OpsA und OpsB angefertigt (**Abb. 31**). Das zytoplasmamembranständige OpsB interagiert mit einem C-terminalen Interaktionspartner mit der Adenylatzyklase und sorgt für eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts. Dieses Signal wird möglicherweise über PKA weiter in den Zellkern übertragen. Alternativ aktiviert OpsB grünlichtabhängig RasA, welche das Signal in den HOG Signalweg überträgt. Dieser wiederum wird vom Phytochrom sowie dem WCC beeinflusst. Das vakuolenmembranständige OpsA ist vermutlich essentiell für eine voll funktionsfähige Vakuole und interagiert zudem mit dem etablierten Lichtkomplex. Aufgrund der Ähnlichkeit der Funktionen im pH Haushalt geschieht dies vermutlich durch direkte oder indirekte Interaktion mit WC-1.

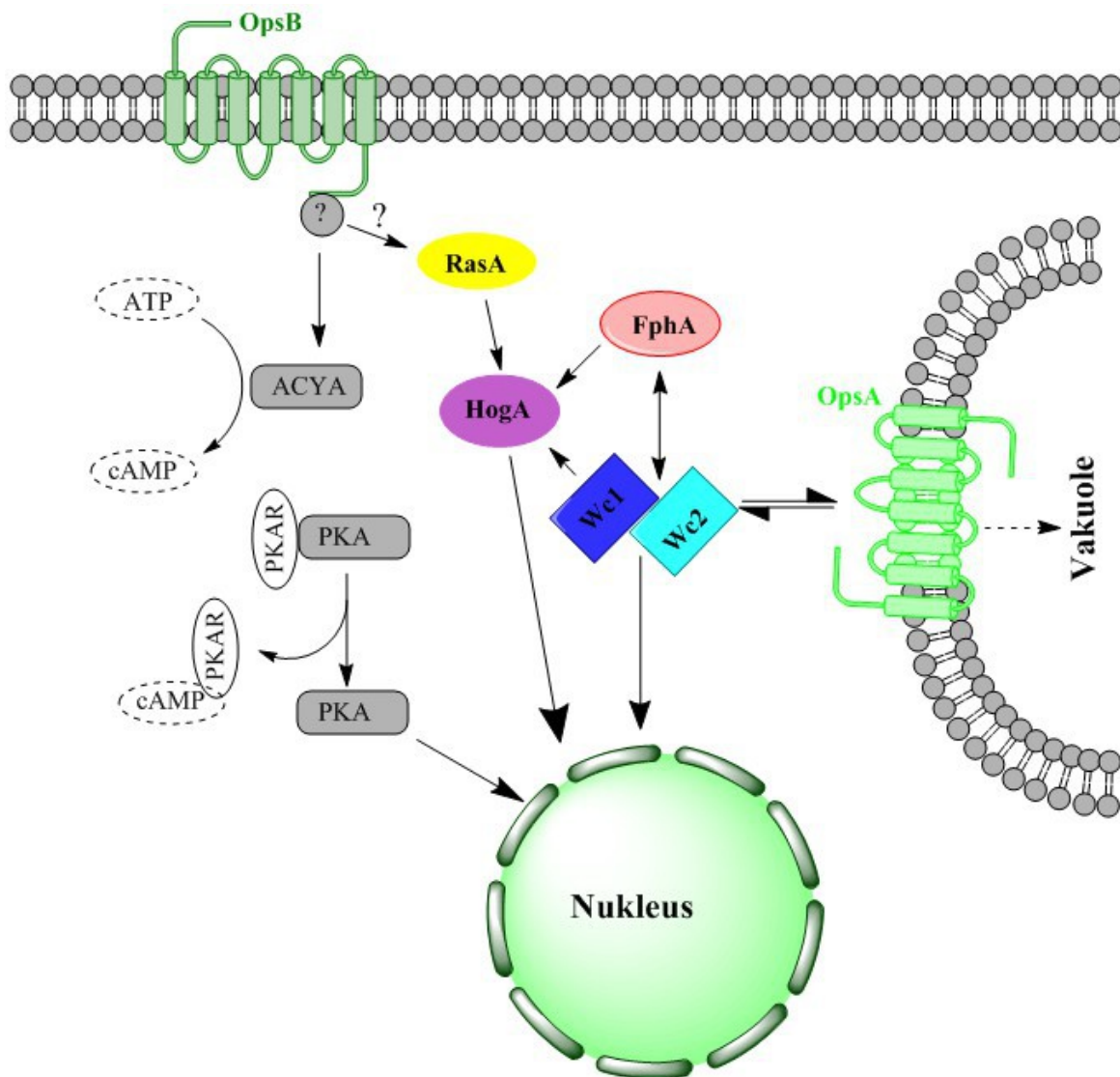


Abbildung 31: Mögliches Schema zur Signalweiterleitung der membranständigen Opsine in *A. alternata*. Die Proteine zur Lichtwahrnehmung bilden ein Lichtwahrnehmungsnetzwerk. OpsB induziert Grünlicht-unabhängig die Keimung der Sporen über den cAMP-PKA Signalweg. Durch Grünlichtbestrahlung ist OpsB verantwortlich für die Aktivierung von HogA, vermutlich über RasA oder andere Schnittstellen. OpsA kann, neben seinem Beitrag zur vollen Funktionsfähigkeit der Vakuole, durch direkte oder indirekte Interaktion mit WC-1 Reaktionen auf molekularer und genetischer Ebene steuern.

5. Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Kits stammen, sofern im Text nichts anderes angegeben wurde, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Selze), Invitrogen (Karlsruhe), Bionline (Luckenwalde), Qiagen (Hilden), Macherey-Nagel (Düren), Nippon Genetics (Düren) und Biozym (Hessisch Oldendorf). Restriktionsenzyme, Polymerasen und Größenstandards stammen von New England Biolabs (Frankfurt am Main). Die Synthese von Oligonukleotiden und Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von MWG Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt.

5.2 Verwendete Stämme von *A. alternata*, *A. nidulans* und *E. coli*

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *A. alternata*

Stamm	Genotyp	Referenz
ATCC 66981	Wildtyp	Virginia Bioinform. Inst. (Blacksburg); Lawrence Lab
sMW24	ATCC 66981 $\Delta pyrG$	Wenderoth <i>et al.</i> , 2017
sCP1	ATCC 66981 $\Delta pksA$ nach Transformation mit sCP1	Diese Arbeit
sCP2	sMW24 $\Delta opsA$ nach Transformation mit pCP2 und pCP3	Diese Arbeit
sCP3	sMW24 $\Delta opsB$ nach Transformation mit pCP4	Diese Arbeit
sCP4	SCP3 $\Delta opsA$, $\Delta opsB$ nach Transformation mit pCP4	Diese Arbeit
sCP5	SCP2 rekomplementiert mit <i>opsA</i> aus ATCC 66981	Diese Arbeit
sCP6	SCP3 rekomplementiert mit <i>opsB</i> aus ATCC 66981	Diese Arbeit

sCP7	sMW24 transformiert mit pCP5	Diese Arbeit
sCP8	SMW24 transformiert mit pCP6	Diese Arbeit
sCP9	SCP2 nach Transformation mit pCP5	Diese Arbeit
sCP10	SCP3 nach Transformation mit pCP 6	Diese Arbeit
sKV103	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	Kay Vienken, Karlsruhe
sCP11	SKV103 nach Transformation mit pCP7	Diese Arbeit
sCP12	SKV103 nach Transformation mit pCP8	Diese Arbeit

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *E. coli*

Stamm	Genotyp	Referenz
Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC);</i> <i>Ø80lacZΔM15</i> <i>ΔlacX74; recA1; araD139 Δ(ara-leu)7679;</i> <i>galU;</i> <i>galk; rpsL (StrR) endA1; nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

5.3 Kultivierung der Organismen

Alle Kulturen wurden, falls nicht anders beschrieben, entweder statisch im Festmedium (15 g Agar pro Liter) oder im entsprechenden Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben schüttelnd, bei 180 rpm inkubiert. *A. alternata* wurde üblicherweise bei 28 °C und *A. nidulans* sowie *E. coli* bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 3: Verwendete Medien und Lösungen zur Kultivierung von *A.alternata*

Medium oder Lösung	Zusammensetzung pro Liter
Modifiziertes Czapek-Dox	40 g Glucose; 1 g Hefeextrakt; 50 ml Salzstammlösung (pH 5,5)
Regenerationsmedium	342,7 g Saccharose; 0,5 g Casein Hydrolysat; 0,5 g Hefeextrakt, 7,5 g Agar

Salzstammlösung (20x)	20 g NaNO ₃ ; 5 g NH ₄ Cl; 20 g KH ₂ PO ₄ ; 5 g KCl; 5 g NaCl; 10 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 0,2 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
-----------------------	--

Tabelle 4: Verwendete Medium und Lösungen zur Kultivierung von *A. nidulans*

Medium oder Lösung	Zusammensetzung pro Liter
Minimalmedium (MM)	50 ml Salzstammlösung; 20 g Glucose; 1 ml Spurenelementlösung; mit 10 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt (+ entsprechende Selektionsmarker)
Salzstammlösung (20x)	120 g NaNO ₃ ; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 30,4 g KH ₂ PO ₄
Spurenelementlösung (1000x)	22 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 11 g H ₃ BO ₃ ; 5 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O; 5 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O; 1,6 g CoCl ₂ x 5 H ₂ O; 1,6 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 50 g Na ₄ EDTA; mit Kaliumhydroxidplätzchen auf pH 6,5-6,8 einstellen

Tabelle 5: Verwendete Selektionsmarker für *A. alternata* und *A. nidulans*

Marker	Eingesetzte Menge
Uracil	1 g/l
Uridin	1 g/l
Hygromycin	80 µg/ml
Pyridoxin	0,1 mg/l

Tabelle 6: Verwendete Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung pro Liter
Luria Bertani (LB)	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl
Super optimal broth with catabolic repression (SOC)	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,58 g NaCl; 0,185 g KCl; 2,03 g MgCl ₂ x 7H ₂ O; 2,46 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 3,6 g Glukose

Tabelle 7: Verwendete Antibiotika zur Selektion von *E. coli*

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/l

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1 Plasmide

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Inhalt	Referenz
pFC330	tef1(p)::cas9::tef1(t); AfpyrG; ampR; AMA1	
pFC332	tef1(p)::cas9::tef1(t); hph; ampR; AMA1	
pFC334	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::sgRNA AnyA::trpC(t); Afpyr4; ampR; AMA1	
pCP1	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::sgRNA pksA::trpC(t); Afpyr4; ampR; AMA1	
pCP2	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::opsA-sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit
pCP3	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::opsA-sgRNA cassette2::trpC(t); URA3; ampR; AMA1	Diese Arbeit

pCP4	tef1(p)::cas9::tef1(t); gpdA(p)::opsB-sgRNA cassette1::trpC(t); hph; ampR; AMA1	Diese Arbeit
pCP5	opsA(p)::opsA::gfp::trpC(t); pyr-4; ampR	Diese Arbeit
pCP6	opsB(p)::opsB::gfp::trpC(t); pyr-4; ampR	Diese Arbeit
pCP7	opsA(p)::opsA::trpC(t); pyr-4; ampR	Diese Arbeit
pCP8	opsB(p)::opsB::trpC(t); pyr-4; ampR	Diese Arbeit

5.4.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Tabelle 9: Verwendete Lösungen zur Präparation

Lösung	Zusammensetzung
Zell-Suspensionspuffer	50 mM TrisHCl pH 7,5 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg/ml Rnase
Zell-Lysispuffer	0,2M NaOH 1% SDS
Kaliumacetatlösung	1,5 M KAc, pH 4,8

Für eine Plasmidpräparation im Mini-Maßstab aus *E. coli* wurden zunächst einzelne Kolonien von LB-Festmedium, mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers, in Reagenzgläser mit 3 ml LB-Flüssigmedium (+100 mg/l Ampicillin) überführt und schüttelnd bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden steril in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 200 µl Zell-Suspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Hierfür wurden 200 µl Zell-Lysispuffer hinzugegeben, das Reaktionsgefäß drei mal invertiert und für 1,5 bis zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 200 µl Kaliumacetatlösung und zehn minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proteine gefällt. Die ausgefällten Proteine wurden mitsamt der Zelltrümmer für zehn Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C pelletiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA wurden 500 µl

vorgekühltes 100 %iges Isopropanol zum Überstand hinzu gegeben, für zehn Minuten auf Eis inkubiert und für weitere zehn Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das entstandene Pellet in 500 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, nochmal für drei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und bei 68 °C und offenem Deckel getrocknet. Das getrocknete Plasmid-DNA Pellet wurde in 50 µl ddH₂O bei 68 °C schüttelnd resuspendiert.

Sollte die Plasmid-DNA für eine Protoplastentransformation weiterverwendet oder sequenziert werden, erfolgte die Präparation mit dem Nucleospin Plasmid Easy Pure Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Hersteller.

5.4.3 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktions-Endonukleasen wurden von New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Der Restriktionsverdau wurde in 10 µl Endvolumen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In der Regel wurden *high-fidelity* Enzyme benutzt. Die Dauer der Inkubation betrug beim Verdau mit einem Enzym 60 Minuten und beim Verdau mit zwei Enzymen 90 Minuten, bei 37 °C.

5.4.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe, wurden sie auf ein 1 % Agarosegel (in 0,5-fachem TAE-Puffer, 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgetragen. Zur späteren Visualisierung der DNA wurde das Agarosegel mit dem Farbstoff MIDORI Green Advance (2 µl/100 ml) der Firma Nippon Genetics (Düren) versetzt. Als Größenvergleich diente die 1 kb DNA-Ladder von NEB, wovon jeweils 5 µl auf das Agarosegel aufgetragen wurde. Nachdem das Gel in 0,5-fachem TAE-Puffer für etwa 30 Minuten einer Spannung von 135 V ausgesetzt waren, wurde es mit einem Fas V Geldokumentationssystem (Nippon Genetics, Düren) betrachtet und fotografiert. Sollten DNA-Fragmente weiterverwendet werden, wurde sie aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des FastGene Gel/PCR Extraction Kits (Nippon Genetics, Düren) aufgereinigt. Die Qualität und Quantität der aufgereinigten DNA wurde dem Nanodrop Spektrometer ND-1000 von der Firma Peqlab (Erlangen) bestimmt.

5.4.5 Isolation genomischer DNA aus *A. alternata*

Tabelle 10: Verwendete Lösungen für die Extraktion genomischer DNA aus *A. alternata*

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	50 mM EDTA 0,2 % SDS
3 M Kaliumacetatlösung	29,45 g Kaliumacetat in 60 ml ddH ₂ O lösen; Zugabe von 11,5 ml Essigsäure; pH mit konzentrierter HCl auf 4,2 einstellen; auf 100 ml mit ddH ₂ O auffüllen
TE-Puffer	10 mM TrisHCl pH 7,4 1 mM EDTA pH 8,0

Zur Isolation genomischer DNA aus *A. alternata* wurden Sporen des zu untersuchenden Stammes von bewachsenem Festmedium abgenommen und in Flüssigmedium in einer Petrischale statisch inkubiert, bis eine Kamhaut entstand. Diese wurde zwischen zwei Papiertüchern trocken gepresst, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. Die Extraktion der DNA aus dem pulverisierten Myzel erfolgte in einem 2 ml Reaktionsgefäß, nach Zugabe von 1 ml Extraktionspuffer bei 68 °C bei leichtem Schütteln für 60 Minuten. Anschließend wurden die Zelltrümmer für zwei Minuten bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zur Fällung der Proteine wurde der Überstand mit 100 µl 3 M Kaliumacetatlösung versehen, zehn Minuten auf Eis inkubiert und weitere zehn Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgte mit 1 ml eiskaltem Isopropanol (100 %) und zehnminütiger Inkubation auf Eis. Danach wurde die DNA für zehn Minuten bei 4 °C pelletiert, mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen (13.000 rpm, drei Minuten) und bei 68 °C luftgetrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

5.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für alle PCR-Reaktionen wurden die Polymerasen Phusion® oder Q5 von New England Biolabs (Frankfurt) eingesetzt. Benutzte Thermocycler stammten von der Firma Sensoquest. Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle XXX) wurden von der Firma MWG-Eurofins synthetisiert. Alle Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt, wobei die Endkonzentration der Oligonukleotide 2 pmol/µl und die Endkonzentration der dNTPs 200 µmol/µl betrug. Die variablen Parameter des PCR-Protokolls wurden an die jeweiligen Längen der zu amplifizierenden DNA-Sequenzen beziehungsweise der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, nach Angaben des Herstellers angepasst. Die Denaturierung fand bei 98 °C und die Elongation bei 72 °C statt. Die eingesetzten Mengen der Template-DNA wurde ebenfalls dem Herstellerprotokoll entnommen. Die Amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Gelelektrophorese von den übrigen Komponenten der Reaktion getrennt. Sollten die Fragmente weiterverwendet werden, wurden sie mit dem FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Düren) aufgereinigt.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz
Crispy for	GGTCATAGCTGTTTCCGCTGA
Crispy rev	TGATTCTGCTGTCTCGGCTG
Proto pksA for	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCCGAC CAGTACCCGCTCCTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAA
HH pksA rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GCCGACCCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
Proto opsA1 for	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCGGAAG TCTTGAAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAA
HH opsA1 rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GGGAAGTCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
Proto opsA2 for	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCATGCT GGACAGAAGACGCTTGTTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAA

HH opsA2 rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GATGCTGCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
Proto opsB for	GTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCAACA CCGTCAACGGTGCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAA
HH opsB rev	GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCA GCAACACCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
OpsA crisp test for	GTAGCGGGAACCAATCAATAGCG
OpsA crisp test rev	CTGCGGTGAGGGTGATGAT
OpsB crisp test for	CGAGATATGTCGTCATGACGGC
OpsB crisp test rev	CTCGGCGACTCCCCATG
PksA crisp test for	GACGCCGGGTTATGAGCAAG
PksA crisp test rev	CACACCACCTGTGATGAAGTAG
OpsA rec for	ATAGAATTCGTATGGAAAGAGCTTGCAATAGATGAA G
OpsA rec rev	ATATTAATTAACAGTCGATCTTGTCGAGGAATG
OpsB rec for	ATAGAATTCGCAATTTGCGGAAATCTCTCATTAGTT
OpsB rec rev	ATATTAATTAACGTCGACCCTTCTGCGG
PopsA EcoRI for	ATAGAATTCGTGTCGCGATGCTCGTTGTAA
PopsA2.0 EcoRI for	ATAGAATTCGTATGGAAAGAGCTTGCAATAGATGAA G
PopsA Ascl rev	ATAGGCGCGCCGATGGCGATTTGGTGTTGTG
PopsB EcoRI for	ATAGAATTCGCAATTTGCGGAAATCTCTCATTAGTT
OpsA for GFP for	CACAACACCAAATCGCCATCGGATGATTGAGGAAGT CTTGAAGAAG
OpsA for GFP rev	GTTCTTCTCCTTTACTGGTTGCCGCAGCAGGTACAG CAGCACCGTCGTCCTCAC
GFP for OpsA for	GAGGACGACGGTGCTGCTGTACCTGCTGCGGCAA CCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG
GFP for OpsA rev	GCTGTTTGATGATTTTCAGTAACGTTAAGTATTA TTGTATAGTTCATCCATGCC
OpsB for GFP for	AATTGACAACCTTCTTCGCAGGATGGATCTCGCTCG TAGAAACAAC
OpsB for GFP rev	TCCTTTACTGGTTGCCGCAGCAGGTACAGCAACAG TGTTGTCGACATGAGGAG

GFP for OpsB for	CAACACTGTTGCTGTACCTGCTGCGGCAACCAGTA AAGGAGAAGAACTTTTCACTG
GFP for OpsB rev	GGGTTGGGATGAGGTCGACATGGCTATTTGTATAGT TCATCCATGCC
H2B RT for	ACAAGAAGAAGCGCACCAAG
H2B RT rev	CGTTGACGAAAGAGTTGAGAAT
opsA RT for	GATCGCCTCTGCTGGAATC
opsA RT rev	CTGCGGTGAGGGTGATGAT
opsB RT for	ATGGATCTCGCTCGTAGAAACAA
opsB RT rev	TAGAAGTCGGATCCATGTGTTGT
CatA RT for	CCCTTCCCCTTCACCATTTC
CatA RT rev	TCAAGGTGGTGGTCTGCTA
SodB RT for	ACAGCCTCTTCTGGGAGAA
SodB RT rev	TGCCGTAGCTGTTGTTGATG
CcgA RT for	TTGGCTGGATGAACAAGCAC
CcgA RT rev	TACTCCACTTGGTGGGTGT
PacC RT for	CTCCCATCCAGCAGAATGCC
PacC RT rev	GCAGACGGTCACCACAGTTT

5.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

Nachdem PCR-Produkte, wie oben beschrieben, aus dem Gel aufgereinigt wurden, wurden diese bei einer Klonierung über Restriktionsschnittstellen mit den entsprechenden Endonukleasen verdaut. Anschließend wurden die Verdau-Reaktionen durch Hitzeinaktivierung der Enzyme gestoppt. War eine Hitzeinaktivierung nicht möglich, wurden die Fragmente nochmals durch Gelextraktion aufgereinigt. Die Klonierung erfolgte mittels T4-Ligase (NEB) nach Angaben des Herstellers. Alternativ wurde ein *Gibson assembly* durchgeführt. Hierfür besaßen die verwendeten Oligonukleotide 20 bp komplementär zum Plasmid oder im Falle einer Fusion von Fragmenten zueinander. Die hierfür eingesetzte DNA wurde in äquimolarer Konzentration in 15 µl Reaktionsmastermix gegeben und auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Die Klonierung erfolgte für 30 Minuten bei 50 °C.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Lösungen für die *Gibbson assembly* Reaktion

Lösung	Zusammensetzung
Iso-Puffer (5x)	3 ml 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 300 µl 1 M MgCl ₂ 60 µl 100 mM dGTP 60 µl 100 mM dATP 60 µl 100 mM dTTP 60 µl 100 mM dCTP 300 µl 1 M DTT 1.5 g PEG-8000 300 µl 100 mM NAD Auf 6 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Reaktionsmastermix (1,33x)	320 µl 5x ISO-Puffer 0.64 µl 10 U/µl T5 Exonuklease 20 µl 2 U/µl Phusion DNA Polymerase 160 µl 40 U/µl Taq DNA Ligase 860 µl ddH ₂ O Jeweils 15 µl/Aliquot

5.4.8 Transformation von *E. coli*

Um eine erfolgreiche Klonierung von Plasmiden zu überprüfen und ausreichende Verfügbarkeit zu gewährleisten wurden Plasmide zunächst in *E. Coli* eingebracht. Hierfür wurden chemisch-kompetente Top10 Zellen verwendet. 5 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl Top10 Zellen gegeben. Nach Mischen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Zur Regeneration der Zellen wurden 300 µl, auf 37 °C vorgewärmtes, SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurden 50 µl auf einer LB Platte mit Ampicillin und der Rest des Ansatzes auf einer separaten Platte gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37 °C statisch inkubiert. Zur Bestätigung der erfolgreichen Klonierung des jeweiligen Plasmids wurden Plasmidpräparationen mit anschließendem Restriktionsverdau durchgeführt.

5.4.9 Transformation von *A. alternata*

Tabelle 13: Verwendete Lösungen und Medien für die Transformation von *A. Alternata*

Lösung oder Medium	Zusammensetzung pro Liter
0,7 M NaCl	40,9 g NaCl
STC	182,2 g Sorbitol 10ml 1 M TrisHCl, pH 7,5 10ml 1 M CaCl ₂
PEG in STC	40 % (w/v) PEG 4000 in STC
Regenerationsmedium	342,3 g Saccharose 5 g Hefeextrakt 5 g Casein-Hydrolysat 7,5 g Agar

Konidiosporen des zu transformierenden Stammes wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels und etwas Flüssigmedium von einer Platte abgelöst und in 50 ml flüssigem mCDB bei 28 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde durch doppellagiges Miracloth® abfiltriert und mit 0,7 M NaCl gewaschen. Der Zellwandverdau wurde in 15 ml 0,7 M NaCl-Lösung, in dem eine Spatelspitze Kitalase® (Wako Chemicals GmbH, Neuss) gelöst wurde, durchgeführt. Das Myzel wurde bei 30 °C und 100 rpm in der Kitalase®-Lösung inkubiert. Nach 90 Minuten wurde der Zellwandverdau lichtmikroskopisch überprüft. Gegebenenfalls wurde die Zellwand für weitere 30 Minuten verdaut. Waren genügen Protoplasten vorhanden wurden diese mittels abfiltrieren durch doppellagiges Miracloth® vom Myzel getrennt. Um die Kitalase® von den Protoplasten zu trennen, wurde die Lösung in einem 50 ml Falcon für 10 Minuten bei 2430 rpm zentrifugiert (Hettich UNIVERSAL-320R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit etwa 20 ml kalter 0,7 M NaCl-Lösung, bei 4 °C gewaschen. Das Pellet wurde in STC gelöst und pro Transformationsansatz 100 µl der gelösten Protoplasten in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Pro Transformationsansätze wurden 5 µg der entsprechenden Plasmid-DNA hinzugegeben und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, gefolgt von einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Anschließend wurden die Protoplasten in ein 50 ml Falcon überführt und mit 1 ml PEG in STC sanft gemischt. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 ml handwarmes, flüssiges Regenerationsmedium zu dem Ansatz gegeben, der Inhalt durch invertieren gemischt und

auf zwei leere, sterile Petrischalen aufgeteilt. Die gegossenen Platten wurden bei 28 °C inkubiert. Wurde auf Hygromycin selektiert, wurden die Platten am nächsten Tag mit 80 µg/ml Hygromycin in 15 ml Regenerationsmedium überschichtet.

5.4.10 Transformation von *A. nidulans*

Tabelle 14: Verwendete Lösungen und Medien zur Transformation von *A.nidulans*

Lösungen und Medien	
Glucose (10x)	
Ammonium Tartrat (100x)	
MMR (500 ml)	
MMR-Top (50 ml)	
Lösung 2 (50 ml)	
Lösung 5	
Lösung 6	
Lösung 7	
Lösung 8	
Salzstammlösung (1 L, 50x)	

Von einer Platte des zu transformierenden Stammes wurden mit etwas flüssigem MM (mit entsprechenden Markern) Sporen abgenommen und über Nacht in 150 ml MM bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die gewachsenen Kultur wurde durch doppellagiges Miracloth® filtriert und etwas von dem Myzel in 10 ml mit Vinotaste®Pro (Novozymes) gegeben. Der Zellwandverdau erfolgte für 90 bis 120 Minuten bei 30 °C und 100 rpm und wurde anschließend mit Hilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Waren genügend Protoplasten in der Suspension vorhanden, wurde sie mit Lösung 2 auf ein Gesamtvolumen von 15 ml aufgefüllt, vorsichtig mit 10 ml kalter Lösung 5 überschichtet, sodass zwei Phasen sichtbar waren und für 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Hettich UNIVERSAL-320R). Während der Zentrifugation sammeln sich die Protoplasten in der Interphase und konnten so mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in eine neues, steriles 50 ml Falcon überführt werden. Anschließend wurden die Protoplasten mit dem doppelten Volumen kalter Lösung 6 versehen und nochmals für 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml kalter Lösung 6 für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde das Pellet in kalter Lösung 7 resuspendiert und pro

Transformationsansatz 200 µl der Protoplastensuspension in ein steriles 50 ml Falcon überführt. Dazu wurden etwa 10 µg der entsprechenden DNA gegeben, sanft gemischt und mit 100 µl Lösung 8 versehen. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurde 1 ml Lösung 8 hinzugegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 5 ml mit Lösung 7 aufgefüllt, danach auf 35 ml mit handwarmem MMR-Top Agar aufgefüllt und nach vorsichtigem Invertieren wurde der Transformationsansatz auf zwei Platten MMR mit entsprechenden Markern aufgeteilt. Nach Erstarren des MMR-Top Agars wurden die Platten bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien zu sehen waren.

5.4.11 Isolation von RNA

Die Extraktion von RNA wurde mit dem Fungal RNA Mini Kit von Omega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde ein DNase Verdau mit dem Turbo DNA-free™ Kit von Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe) nach Angaben des Hersteller durchgeführt.

5.4.12 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Für alle Genexpressionsanalysen wurden biologische Triplikate und technische Duplikate erstellt. Zur Normalisierung der gemessenen Werte diente das Histon 2B-Gen. Alle Proben isolierter RNA wurden mit Diethylcarbonat (DEPC) behandeltem Wasser auf die Konzentration 50 ng/µl eingestellt. Die Konzentration der Primer wurden ebenfalls mit DEPC behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Für die Reaktionen wurden die Reagenzien des **SensiFAST™** SYBR No-ROX One-Step Kit von Biorad benutzt. Die Zusammensetzung jedes qRT-PCR Ansatzes war wie folgt: 12,5 µl 2x SensiFAST SYBR No-Rox One-Step Mix, je 1 µl des forward- und reverse-Primers, 0,5 µl RiboSafe RNase-Inhibitor, 0,25 µl Reverse Transkriptase, 7,75 µl Nukleasefreies Wasser und 2 µl RNA. Die Reaktionen fanden im Biorad CFX Connect Real-Time System mit folgenden Einstellungen statt: Initiale reverse Transkription für zehn Minuten bei 45 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung der Transkriptase bei 95 °C für zwei Minuten. Denaturierung bei 95 °C für fünf Sekunden. *Annealing* für 20 Sekunden bei 58 °C. Elongation bei 60 °C für 30 Sekunden. Die Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation wurden 40 mal als Zyklen ausgeführt.

5.4.13 Immunfluoreszenz

Frische Sporen wurden in 400 µl mCDB auf einem abgeflammt Deckgläschen in einer sterilen Petrischale für 12 Stunden in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden entweder in vollständiger Dunkelheit fixiert oder zuvor für fünf Minuten mit Licht bestrahlt. Die Fixierung fand bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd in PBS statt. Anschließend wurden die Deckgläschen drei mal für 10 Minuten in PBS gewaschen und in eine neue Petrischale übertragen. Dann wurden die Deckgläschen mit 200 µl Verdauungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder drei mal mit PBS für zehn Minuten gewaschen. Die Deckgläschen wurden für zehn Minuten bei -20 °C mit vorgekühltem Methanol inkubiert. Der Methanol wurde abgegossen und die Deckgläschen drei mal für fünf Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen. Nun wurden die Deckgläschen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 µl Blockierlösung (1 % BSA in PBS) behandelt. Die Deckgläschen wurden in eine neue Petrischale transferiert und 200 µl der primär-Antikörperlösung (phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 1:400 verdünnt in PBS mit 5 % BSA) dazugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben drei mal für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen. Anschließend wurden 200 µl der sekundär-Antikörperlösung (Cy3-konjugierter anti-rabbit IgG 1:200 verdünnt in TBST mit 5 % BSA) dazugegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen drei mal für zehn Minuten mit TBST gewaschen und auf Objektträgern mit Nagellack versiegelt.

6. Literaturverzeichnis

Achstetter, T., and Wolf, D.H. (1985). Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1**, 139-157.

Adam, A., Deimel, S., Pardo-Medina, J., Garcia-Martinez, J., Konte, T., Limon, M.C., Avalos, J., and Terpitz, U. (2018). Protein Activity of the *Fusarium fujikuroi* Rhodopsins CarO and OpsA and Their Relation to Fungus-Plant Interaction. *Int J Mol Sci* **19**.

Annis, S.L., & Goodwin, P.H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* **103**, 1-14.

Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., and Wada, Y. (1989). Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **21**, 589-603.

Avalos, J., and Estrada, A.F. (2010). Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genet Biol* **47**, 930-938.

Baars, T.L., Petri, S., Peters, C., and Mayer, A. (2007). Role of the V-ATPase in regulation of the vacuolar fission-fusion equilibrium. *Mol Biol Cell* **18**, 3873-3882.

Balashov, S.P., Imasheva, E.S., Boichenko, V.A., Anton, J., Wang, J.M., and Lanyi, J.K. (2005). Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science* **309**, 2061-2064.

Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H., and Macino, G. (1998). Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol Microbiol* **29**, 719-729.

Bateman, D.F., and Beer, S.V. (1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium Rolfsii*. *Phytopathology* **55**, 204-211.

Bayer, M.J., Reese, C., Buhler, S., Peters, C., and Mayer, A. (2003). Vacuole membrane fusion: V0 functions after trans-SNARE pairing and is coupled to the Ca²⁺-releasing channel. *J Cell Biol* **162**, 211-222.

Bayram, O., Braus, G.H., Fischer, R., and Rodriguez-Romero, J. (2010). Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **47**, 900-908.

Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**, 39.

Bieszke, J.A., Braun, E.L., Bean, L.E., Kang, S., Natvig, D.O., and Borkovich, K.A. (1999a). The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8034-8039.

Bieszke, J.A., Spudich, E.N., Scott, K.L., Borkovich, K.A., and Spudich, J.L. (1999b). A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry* **38**, 14138-14145.

Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., and Sunnerhagen, P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**, 1743-1756.

Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**, 1833-1838.

Booth, J.W., and Guidotti, G. (1997). Phosphate transport in yeast vacuoles. *J Biol Chem* **272**, 20408-20413.

Bowen, J.K., Templeton, M.D., Sharrock, K.R., Crowhurst, R.N., and Rikkerink, E.H. (1995). Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene pnlA. *Mol Gen Genet* **246**, 196-205.

- Brandt, S., von Stetten, D., Gunther, M., Hildebrandt, P., and Frankenberg-Dinkel, N. (2008).** The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **283**, 34605-34614.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J., and Nising, C.F. (2009).** Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem Rev* **109**, 3903-3990.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., and Gustin, M.C. (1993).** An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**, 1760-1763.
- Brown, L.S. (2004).** Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 555-565.
- Bruce, J.I., Straub, S.V., and Yule, D.I. (2003).** Crosstalk between cAMP and Ca²⁺ signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium* **34**, 431-444.
- Brunk, M., Spath, S., Doose, S., van de Linde, S., and Terpitz, U. (2018).** HyphaTracker: An ImageJ toolbox for time-resolved analysis of spore germination in filamentous fungi. *Sci Rep* **8**, 605.
- Bush, R.K., and Prochnau, J.J. (2004).** *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 227-234.
- Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M.A., Tudzynski, P., and Larrondo, L.F. (2013).** Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: characterization of the White Collar Complex. *PLoS One* **8**, e84223.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., and Herrera-Estrella, A. (2004).** BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* **150**, 3561-3569.

- Castellanos, F., Schmoll, M., Martinez, P., Tisch, D., Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., and Esquivel-Naranjo, E.U. (2010).** Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol* **47**, 468-476.
- Chen, C.H., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2010).** *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet Biol* **47**, 922-929.
- Cohen, R.J. (1974).** Cyclic AMP levels in *Phycomyces* during a response to light. *Nature* **251**, 144-146.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013).** Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., and Thevelein, J.M. (2014).** Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 254-299.
- Corrochano, L.M. (2019).** Light in the fungal world: from photoreception to gene transcription and beyond. *Annu Rev Genet* **53**, 149-170.
- Dasgupta, A., Fuller, K.K., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2016).** Seeing the world differently: variability in the photosensory mechanisms of two model fungi. *Environ Microbiol* **18**, 5-20.
- Davis, R.H. (1986).** Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **50**, 280-313.
- Day, A.M., and Quinn, J. (2019).** Stress-activated protein kinases in human fungal pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 261.

De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A., and Fonzi, W.A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**, 3317-3325.

de Nadal, E., and Posas, F. (2015). Osmostress-induced gene expression--a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS J* **282**, 3275-3285.

Denison, S.H. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* **29**, 61-71.

DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., and Church, G.M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* **41**, 4336-4343.

Dirschnabel, D.E., Nowrousian, M., Cano-Dominguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., and Kuck, U. (2014). New insights into the roles of NADPH oxidases in sexual development and ascospore germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* **196**, 729-744.

Eaton, C.J., Jourdain, I., Foster, S.J., Hyams, J.S., and Scott, B. (2008). Functional analysis of a fungal endophyte stress-activated MAP kinase. *Curr Genet* **53**, 163-174.

Edmondson, D.A., Nordness, M.E., Zacharisen, M.C., Kurup, V.P., and Fink, J.N. (2005). Allergy and "toxic mold syndrome". *Ann Allergy Asthma Immunol* **94**, 234-239.

Eshel, D., Lichter, A., Dinoor, A., and Prusky, D. (2002a). Characterization of *Alternaria alternata* glucanase genes expressed during infection of resistant and susceptible persimmon fruits. *Mol Plant Pathol* **3**, 347-358.

Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinoor, A., and Prusky, D. (2002b). pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 774-779.

- Fan, Y., Solomon, P., Oliver, R.P., and Brown, L.S. (2011).** Photochemical characterization of a novel fungal rhodopsin from *Phaeosphaeria nodorum*. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 1457-1466.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., and Silver, P.A. (1998).** Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* **17**, 5606-5614.
- Fillinger, S., Chaveroche, M.K., Shimizu, K., Keller, N., and d'Enfert, C. (2002).** cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **44**, 1001-1016.
- Fischer, R., Aguirre, J., Herrera-Estrella, A., and Corrochano, L.M. (2016).** The complexity of fungal vision. *Microbiol Spectr* **4**.
- Frigaard, N.U., Martinez, A., Mincer, T.J., and DeLong, E.F. (2006).** Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. *Nature* **439**, 847-850.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002).** White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**, 815-819.
- Froehlich, A.C., Noh, B., Vierstra, R.D., Loros, J., and Dunlap, J.C. (2005).** Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**, 2140-2152.
- Fuller, K.K., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2016).** Fungal light sensing at the bench and beyond. *Adv Genet* **96**, 1-51.
- Fuller, K.K., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2015).** Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Curr Genet* **61**, 275-288.

Gao, S., Choi, G.H., Shain, L., and Nuss, D.L. (1996). Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1984-1990.

Gao, Y., and Zhao, Y. (2014). Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol* **56**, 343-349.

Garcia-Maceira, F.I., Di Pietro, A., and Roncero, M.I. (2000). Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 359-365.

Garcia-Martinez, J., Brunk, M., Avalos, J., and Terpitz, U. (2015). The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Sci Rep* **5**, 7798.

Garrido-Bazan, V., Jaimes-Arroyo, R., Sanchez, O., Lara-Rojas, F., and Aguirre, J. (2018). SakA and MpkC stress MAPKs show opposite and common functions during stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* **9**, 2518.

Goraya, T.A., and Cooper, D.M. (2005). Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): current perspectives. *Cell Signal* **17**, 789-797.

Guo, W., Gonzalez-Candelas, L., and Kolattukudy, P.E. (1995). Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *J Bacteriol* **177**, 7070-7077.

ten Have, A., Beuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J. and van Kan, J.A.L. (2001). Botrytis cinerea endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet. Biol.* **33**, 97–105.

Hayashi, M., and Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **139**, 797-803.

He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**, 840-843.

Hedtke, M., Rauscher, S., Rohrig, J., Rodriguez-Romero, J., Yu, Z., and Fischer, R. (2015). Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves the interplay of phytochrome and white collar-regulated histone H3 acetylation. *Mol Microbiol* **97**, 733-745.

Heller, J., Ruhnke, N., Espino, J.J., Massaroli, M., Collado, I.G., and Tudzynski, P. (2012). The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 802-816.

Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167-170.

Huang, G., Huang, Q., Wei, Y., Wang, Y., and Du, H. (2019). Multiple roles and diverse regulation of the Ras/cAMP/protein kinase A pathway in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **111**, 6-16.

Hwang, W.Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.R., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 227-229.

Idnurm, A., and Crosson, S. (2009). The photobiology of microbial pathogenesis. *PLoS Pathog* **5**, e1000470.

Idnurm, A., and Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* **3**, e95.

Idnurm, A., and Heitman, J. (2010). Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi. *Microbiology* **156**, 2393-2407.

Igbalajobi, O., Yu, Z., and Fischer, R. (2019). Red- and blue-light sensing in the plant pathogen *Alternaria alternata* depends on phytochrome and the white-collar protein LreA. *MBio* **10**.

Jennings, D.H. (1989). Some perspectives on nitrogen and phosphorus metabolism in fungi. In: Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi (Boddy, L., Machant, R. and Read, D.J., eds), pp. 1–31. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* **15**, 29-33.

Jones, E.W. (1984). The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Annu Rev Genet* **18**, 233-270.

Kane, P.M. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 177-191.

Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**, 1153-1163.

Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* **661**, 3-38.

Kim, H., Ahn, J.H., Gorlach, J.M., Caprari, C., Scott-Craig, J.S., and Walton, J.D. (2001). Mutational analysis of beta-glucanase genes from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1436-1443.

Kim, H., Son, H., and Lee, Y.W. (2014). Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*. *J Appl Microbiol* **116**, 380-389.

Klionsky, D.J., Nelson, H., and Nelson, N. (1992a). Compartment acidification is required for efficient sorting of proteins to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **267**, 3416-3422.

Klionsky, D.J., Nelson, H., Nelson, N., and Yaver, D.S. (1992b). Mutations in the yeast vacuolar ATPase result in the mislocalization of vacuolar proteins. *J Exp Biol* **172**, 83-92.

Kornfeld, S., and Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 483-525.

Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**, 1002-1012.

Lamb, T.M., Finch, K.E., and Bell-Pedersen, D. (2012). The *Neurospora crassa* OS MAPK pathway-activated transcription factor ASL-1 contributes to circadian rhythms in pathway responsive clock-controlled genes. *Fungal Genet Biol* **49**, 180-188.

Lamparter, T., Krauss, N., and Scheerer, P. (2017). Phytochromes from *Agrobacterium fabrum*. *Photochem Photobiol* **93**, 642-655.

Lara-Rojas, F., Sanchez, O., Kawasaki, L., and Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol Microbiol* **80**, 436-454.

Lawrence, C.L., Botting, C.H., Antrobus, R., and Coote, P.J. (2004). Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol* **24**, 3307-3323.

Lee, H.B., Patriarca, A., and Magan, N. (2015). *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology* **43**, 93-106.

Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., and Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-785.

Levina, N.N., Dunina-Barkovskaya, A.Y., Shabala, S., and Lew, R.R. (2002). Blue light modulation of ion transport in the slime mutant of *Neurospora crassa*. *J Membr Biol* **188**, 213-226.

Li, B., Lai, T., Qin, G., and Tian, S. (2010). Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: a proteomic-based study. *J Proteome Res* **9**, 298-307.

Linden, H., and Macino, G. (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**, 98-109.

Liu, G.T., Qian, Y.Z., Zhang, P., Dong, Z.M., Shi, Z.Y., Zhen, Y.Z., Miao, J., and Xu, Y.M. (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci Publ*, 258-262.

Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., and Lin, C. (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci* **16**, 684-691.

Lyu, X., Shen, C., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., and Cheng, J. (2015). The microbial opsin homolog Sop1 is involved in *Sclerotinia sclerotiorum* development and environmental stress response. *Front Microbiol* **6**, 1504.

MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A., and Eide, D.J. (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**, 39187-39194.

Maia, J.C., Gomes, S.L., and Mennucci, L. (1979). Induction of germination in *Blastocladiella emersonii* by cyclic AMP and inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* **12**, 407-410.

Manfiolli, A.O., Siqueira, F.S., Dos Reis, T.F., Van Dijck, P., Schrevens, S., Hoefgen, S., Foge, M., Strassburger, M., de Assis, L.J., Heinekamp, T., et al. (2019). Mitogen-activated protein kinase cross-talk interaction modulates the production of melanins in *Aspergillus fumigatus*. *MBio* **10**.

Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Ecol* **43**, 359-366.

Martinez-Montanes, F., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2010). Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmotic stress in yeast. *OMICS* **14**, 619-627.

Martinez-Munoz, G.A., and Kane, P. (2008). Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem* **283**, 20309-20319.

Matile, P. (1978). Biochemistry and function of vacuoles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**:193-213.

Matsuno-Yagi, A., and Mukohata, Y. (1977). Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun* **78**, 237-243.

McKnight, G.S. (1991). Cyclic AMP second messenger systems. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 213-217.

Mongodin, E.F., Nelson, K.E., Daugherty, S., Deboy, R.T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D.A., Papke, R.T., Sanchez Perez, G., et al. (2005). The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18147-18152.

Murayama, T., Uno, I., Hamamoto, K., and Ishikawa, T. (1985). A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase mutant of *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.* **142**, 109-112.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* **296**, 2395-2398.

Nair, R.B., Gmoser, R., Lennartsson, P.R., and Taherzadeh, M.J. (2018). Does the second messenger cAMP have a more complex role in controlling filamentous fungal morphology and metabolite production? *Microbiologyopen* **7**, e00627.

Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K., Matsumoto, K., and Kaziro, Y. (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1374-1378.

Nimmanee, P., Woo, P.C., Kummasook, A., and Vanittanakom, N. (2015). Characterization of sakA gene from pathogenic dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *Int J Med Microbiol* **305**, 65-74.

Nodvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E., and Mortensen, U.H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* **10**, e0133085.

Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2853-2857.

Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1981). Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **256**, 2079-2082.

Orij, R., Brul, S., and Smits, G.J. (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 933-944.

Ortega, J. (1996). Pectolytic enzymes produced by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tex. J. Sci.* **48**, 123-128.

- Pall, M.L. (1981).** Adenosine 3',5'-phosphate in fungi. *Microbiol Rev* **45**, 462-480.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodriguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., and Prieto, J.A. (2006).** A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**, 4638-4645.
- Panaretou, B., and Piper, P.W. (1992).** The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *Eur J Biochem* **206**, 635-640.
- Panzer, S., Brych, A., Batschauer, A., and Terpitz, U. (2019).** Opsin 1 and Opsin 2 of the corn smut fungus *Ustilago maydis* are green light-driven proton pumps. *Front Microbiol* **10**, 735.
- Pastor, F.J., and Guarro, J. (2008).** *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. *Clin Microbiol Infect* **14**, 734-746.
- Peters, C., Bayer, M.J., Buhler, S., Andersen, J.S., Mann, M., and Mayer, A. (2001).** Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409**, 581-588.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002).** Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 639-650.
- Plant, P.J., Manolson, M.F., Grinstein, S., and Demaurex, N. (1999).** Alternative mechanisms of vacuolar acidification in H(+)-ATPase-deficient yeast. *J Biol Chem* **274**, 37270-37279.
- Poltermann, S., Nguyen, M., Gunther, J., Wendland, J., Hartl, A., Kunkel, W., Zipfel, P.F., and Eck, R. (2005).** The putative vacuolar ATPase subunit Vma7p of *Candida albicans* is involved in vacuole acidification, hyphal development and virulence. *Microbiology* **151**, 1645-1655.

Posas, F., Witten, E.A., and Saito, H. (1998). Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 5788-5796.

Potapova, T.V., Aslanidi, K.B., Belozerskaya, T.A., and Levina, N.N. (1988). Transcellular ionic currents studied by intracellular potential recordings in *Neurospora crassa* hyphae. Transfer of energy from proximal to apical cells. *FEBS Lett* **241**, 173-176.

Prado, M.M., Prado-Cabrero, A., Fernandez-Martin, R., and Avalos, J. (2004). A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr Genet* **46**, 47-58.

Preston, R.A., Murphy, R.F., and Jones, E.W. (1989). Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7027-7031.

Prusky, D., Gold, S. and Keen, N.T. (1989). Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **35**, 121-133

Prusky, D., McEvoy, J.L., Leverentz, B., and Conway, W.S. (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1105-1113.

Prusky, D., and Yakoby, N. (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol Plant Pathol* **4**, 509-516.

Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C.B., and Fischer, R. (2014). Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2582-2591.

Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., and Fischer, R. (2008). Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**, 255-259.

- Qi, M., and Elion, E.A. (2005).** MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**, 3569-3572.
- Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007).** Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-3112.
- Regnacq, M., and Boucherie, H. (1993).** Isolation and sequence of HSP30, a yeast heat-shock gene coding for a hydrophobic membrane protein. *Curr Genet* **23**, 435-442.
- Rispail, N., Soanes, D.M., Ant, C., Czajkowski, R., Grunler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., Valiante, V., et al. (2009).** Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcieneurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **46**, 287-298.
- Robson, G.D., Wiebe, M.G., and Trinci, A.P. (1991).** Exogenous cAMP and cGMP modulate branching in *Fusarium graminearum*. *J Gen Microbiol* **137**, 963-969.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller, S., and Fischer, R. (2010).** Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* **64**, 585-610.
- Rollins, J.A. (2003).** The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 785-795.
- Rollins, J.A., and Dickman, M.B. (2001).** pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Appl Environ Microbiol* **67**, 75-81.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E.U., Casas-Flores, S., Martinez-Hernandez, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., and Herrera-Estrella, A. (2006).** Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* **152**, 3305-3317.
- Rottwinkel, G., Oberpichler, I., and Lamparter, T. (2010).** Bathy phytochromes in rhizobial soil bacteria. *J Bacteriol* **192**, 5124-5133.

- Ruger-Herreros, C., Rodriguez-Romero, J., Fernandez-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L.M., and Canovas, D. (2011).** Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **188**, 809-822.
- Ruijter, G.J.G., van de Vondervoort, P.J.I., and Visser, J. (1999).** Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. *Microbiology* **145** (Pt 9), 2569-2576.
- Russell, M., Lange-Carter, C.A., and Johnson, G.L. (1995).** Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). *J Biol Chem* **270**, 11757-11760.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Salo, P.M., Arbes, S.J., Jr., Sever, M., Jaramillo, R., Cohn, R.D., London, S.J., and Zeldin, D.C. (2006).** Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 892-898.
- Saranak, J., and Foster, K.W. (1997).** Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature* **387**, 465-466.
- Sasaki, J., and Spudich, J.L. (2000).** Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding. *Biochim Biophys Acta* **1460**, 230-239.
- Schumacher, J. (2017).** How light affects the life of Botrytis. *Fungal Genet Biol* **106**, 26-41.
- Schuster, A., Kubicek, C.P., Friedl, M.A., Druzhinina, I.S., and Schmoll, M. (2007).** Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *BMC Genomics* **8**, 449.

Scott-Craig, J.S., Cheng, Y.Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J.W., and Walton, J.D. (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1497-1503.

Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Cervone, F., and Walton, J.D. (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell* **2**, 1191-1200.

Seoighe, C., and Wolfe, K.H. (1999). Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* **238**, 253-261.

Sheng-Cheng, W., Kyung-Sik, H., Darvill, H. and Albersheim, P. (1997). Deletion of the two endo- β -xylanase genes reveals additional isozyme secreted by the rice blast fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 700– 708.

Shiozaki, K., and Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2276-2288.

Sikora, L.A., and Marzluf, G.A. (1982). Regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **150**, 1287-1291.

Spudich, J.L. (1998). Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol Microbiol* **28**, 1051-1058.

Spudich, J.L., and Luecke, H. (2002). Sensory rhodopsin II: functional insights from structure. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 540-546.

Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H., and Spudich, E.N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 365-392.

St Leger, R.J., Joshi, L., and Roberts, D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 709-713.

St Leger, R.J., Joshi, L., and Roberts, D.W. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology* **143** (Pt 6), 1983-1992.

St Leger, R.J., Nelson, J.O., and Screen, S.E. (1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* **145** (Pt 10), 2691-2699.

Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bolker, M., Kahmann, R., and McIntosh, J.R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111** (Pt 15), 2235-2246.

Sudo, Y., Okuda, H., Yamabi, M., Fukuzaki, Y., Mishima, M., Kamo, N., and Kojima, C. (2005). Linker region of a halobacterial transducer protein interacts directly with its sensor retinal protein. *Biochemistry* **44**, 6144-6152.

Sutherland, E.W., and Rall, T.W. (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**, 1077-1091.

Tamaki, H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **104**, 245-250.

Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., and Sowadski, J.M. (1992). Structural framework for the protein kinase family. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 429-462.

Templeton, M.D., Sharrock, K.R., Bowen, J.K., Crowhurst, R.N., and Rikkerink, E.H. (1994). The pectin lyase-encoding gene (pnl) family from *Glomerella cingulata*: characterization of pnlA and its expression in yeast. *Gene* **142**, 141-146.

Thevelein, J.M., and de Winde, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**, 904-918.

Tingle, M.A., Kuenzi, M.T., and Halvorson, H.O. (1974). Germination of yeast spores lacking mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **117**, 89-93.

van der Oost, J., Jore, M.M., Westra, E.R., Lundgren, M., and Brouns, S.J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* **34**, 401-407.

Van Nguyen, T., Kroger, C., Bonnighausen, J., Schafer, W., and Bormann, J. (2013). The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 1378-1394.

Vautard-Mey, G., and Fevre, M. (2003). Carbon and pH modulate the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. *Curr Microbiol* **46**, 146-150.

Veses, V., and Gow, N.A. (2008). Vacuolar dynamics during the morphogenetic transition in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **8**, 1339-1348.

Walton, J.D. (1994). Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiol* **104**, 1113-1118.

Wang, X., Sheff, M.A., Simpson, D.M., and Elion, E.A. (2011). Ste11p MEKK signals through HOG, mating, calcineurin and PKC pathways to regulate the FKS2 gene. *BMC Mol Biol* **12**, 51.

Wang, Z., Li, N., Li, J., Dunlap, J.C., Trail, F., and Townsend, J.P. (2016). The fast-evolving *phy-2* gene modulates sexual development in response to light in the model fungus *Neurospora crassa*. *MBio* **7**, e02148.

Wang, Z., Wang, J., Li, N., Li, J., Trail, F., Dunlap, J.C., and Townsend, J.P. (2018). Light sensing by opsins and fungal ecology: NOP-1 modulates entry into sexual reproduction in response to environmental cues. *Mol Ecol* **27**, 216-232.

Waschuk, S.A., Bezerra, A.G., Jr., Shi, L., and Brown, L.S. (2005). *Leptosphaeria* rhodopsin: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6879-6883.

Wattad, C., Kobilier, D., Dinoor, A. and Prusky, D. (1997). Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **50**, 197–212.

Weber, R.W., Wakley, G.E., Thines, E., and Talbot, N.J. (2001). The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* **216**, 101-112.

Wenderoth, M., Pinecker, C., Voss, B., and Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol* **101**, 55-60.

Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B., and Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2289-2301.

Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K., and Ota, I. (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* **1**, 163-173.

Wong, C.M., Zhou, Y., Ng, R.W., Kung Hf, H.F., and Jin, D.Y. (2002). Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* **277**, 5385-5394.

Wong, W., and Scott, J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 959-970.

Yakoby, N., Beno-Moualem, D., Keen, N.T., Dinoor, A., Pines, O., and Prusky, D. (2001). *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 988-995.

Yakoby, N., Freeman, S., Dinoor, A., Keen, N.T., and Prusky, D. (2000a). Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 887-891.

Yakoby, N., Kobilier, I., Dinoor, A., and Prusky, D. (2000b). pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1026-1030.

Yamashiro, C.T., Kane, P.M., Wolczyk, D.F., Preston, R.A., and Stevens, T.H. (1990). Role of vacuolar acidification in protein sorting and zymogen activation: a genetic analysis of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *Mol Cell Biol* **10**, 3737-3749.

Yoshimasa, T., Sibley, D.R., Bouvier, M., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. (1987). Cross-talk between cellular signalling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation. *Nature* **327**, 67-70.

Yu, Z., Armant, O., and Fischer, R. (2016). Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nat Microbiol* **1**, 16019.

Zhen, Y.Z., Xu, Y.M., Liu, G.T., Miao, J., Xing, Y.D., Zheng, Q.L., Ma, Y.F., Su, T., Wang, X.L., Ruan, L.R., et al. (1991). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer--Linxian, China. *IARC Sci Publ*, 253-257.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Fischer bedanken, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und mir zu jeder Zeit mit gutem Rat zur Seite stand.

Bei Prof. Dr. Tilman Lamparter möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Innerhalb der Arbeitsgruppe geht mein Dank an Christian Pascal Streng und Olumuyiwa Ayokunle Igbalajobi mit denen man in wertvollen Diskussionen alle Fragen zu Licht klären konnte. Mein besonderer Dank geht an das Keller-Labor. Maximilian "RolfDa59" Wenderoth, der mich in die Kunst des "Naria-Bändigens" eingeführt hat und mir immer mit wertvollem Rat zur Seite stand. Lex "Sexy Winanoly" Winandy, der immer noch einen "Geheimtipp" für alle Methoden wusste. Benjamin "Schnorrer-BV" Voß, der weltbeste Motivator, der auch immer ein Ohr und Rat für private Angelegenheiten hatte. Elke "Wortmann" Wohlmann für ihre praktische Unterstützung und natürlich für die Einführung des "classic Wohlmann". Ich bedanke mich auch bei der nächste Generation des Keller-Labors Michael "Messer-Michi" Pitz für die guten privaten und fachlichen Gespräche und Julian "Ingo" Ingelfinger als gutem "Mikroskopie-Buddy". Weiterhin danke ich den Kellerfreunden Jennifer "Hüper Hübner" Hübner, Linda Schlegl und Luis Raupach.

Natürlich bedanke ich mich auch bei dem Rest der Arbeitsgruppe Fischer und allen Angehörigen des 2. Stocks.

Außerhalb des Labors danke ich meiner wundervollen Familie, die immer für mich da war und mir das alles ermöglicht haben.

Mein herzlichster Dank geht an meine Frau Trixi die immer an mich geglaubt hat und mir half, wo immer es ihr möglich war. Ich bin überglücklich mit dir weiterhin die Wunder des Lebens entdecken zu dürfen.

Liste wissenschaftlicher Publikationen

Wenderoth, M., Pinecker, C., Voss, B., and Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol* **101**, 55-60.