

Analyse von Effektorproteinen in Interaktionen von Pilzen der Gattung *Pyricularia* (*Magnaporthe*) mit Gerste

von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Valerie Laura Mogga

aus Siegburg

Berichter: PD Dr. habil. Ulrich Schaffrath
Prof. Holger Deising
Prof. Ralph Panstruga

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Mogga, V.; Delventhal, R.; Weidenbach, D.; Langer, S.; Bertram, P. M.; Andresen, K.; Thines, E.; Kroj, T.; Schaffrath, U.

***Magnaporthe oryzae* effectors MoHEG13 and MoHEG16 interfere with host infection and MoHEG13 counteracts cell death caused by *Magnaporthe*-NLPs in tobacco**

Plant Cell Reports Vol. 35, No. 5, 2016, pp.1169-85.

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
IV.	ABKÜRZUNGEN	VI
V.	SUMMARY	VIII
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	X
1	EINLEITUNG	1
1.1	Pilze der Familie <i>Pyriculariaceae</i>	1
1.2	Das pflanzliche Immunsystem	3
1.3	Nichtwirt-Resistenz	5
1.4	Effektoren	7
	1.4.1 Redundante Funktionen verschiedener Effektoren innerhalb desselben Effektorrepertoires.....	9
	1.4.2 Effektoren und deren Translokation in <i>Magnaporthe oryzae</i>	10
1.5	Andere putative Pathogenitätsfaktoren	12
	1.5.1 NLPs.....	12
	1.5.2 NUDIX Hydrolasen.....	13
1.6	Ziele	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Verwendete Oligonukleotide	15
2.2	Verwendete Plasmid-DNA	19
	2.2.1 pTK144.....	19
	2.2.2 pSilentDual1.....	19
	2.2.3 pB7WG2.....	20
2.3	Verwendete Pilze und Pflanzen	21
	2.3.1 Pilze der Gattung der <i>Pyricularia</i>	21
	2.3.1.1 Kultivierung zur Sporulationsinduktion.....	21
	2.3.1.2 Kultivierung in Flüssigkultur.....	23
	2.3.1.3 Herstellung von Dauerkulturen.....	23
	2.3.2 Versuchspflanzen.....	24
	2.3.2.1 Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>).....	24
	2.3.2.2 <i>Digitaria sanguinalis</i>	24
	2.3.2.3 <i>Nicotiana benthamiana</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	24
	2.3.2.4 Reis (<i>Oryza sativa</i>).....	25
2.4	Inokulation und makroskopische Analyse	25
2.5	<i>In vitro</i> Keimung von Konidiosporen	26
2.6	Mikroskopische Analysen	26
	2.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse.....	27
2.7	Statistische Auswertung	27
2.8	Präparation von RNA	27
	2.8.1 Hot Phenol-Methode.....	27
	2.8.2 Zitronensäuremethode.....	28
2.9	cDNA Synthese	29
2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion	30
	2.10.1 RT-qPCR.....	31
2.11	Gelelektrophorese	32
	2.11.1 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese.....	32
	2.11.2 Denaturierende Gelelektrophorese.....	33
2.12	Klonierungsarbeiten mit <i>E. coli</i>	34

2.12.1	Kultivierung und Transformation	34
2.12.2	Isolation von Plasmid-DNA	35
2.12.3	Restriktionsanalyse.....	36
2.12.4	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
2.12.5	Ligation	36
2.12.6	Gateway® Klonierung	37
2.12.6.1	Generierung von Konstrukten für die Gateway® Klonierung.....	37
2.13	Transformation von <i>M. oryzae</i>	38
2.13.1	DJ-PCR und geteilte Resistenzmarkierung zur Generierung von KO-Konstrukten....	38
2.13.2	Protoplastierung.....	38
2.13.3	Transformationsreaktion.....	39
2.14	Screening der <i>M. oryzae</i> Transformanden	40
2.14.1	Präparation von gDNA.....	41
2.14.2	Southern Blot.....	41
2.14.2.1	Restriktionsverdau der gDNA.....	42
2.14.2.2	Aufwärtsgerichteter Kapillartransfer	43
2.14.2.3	Sondenherstellung	43
2.14.2.4	Prähybridisierung und Sondenhybridisierung.....	44
2.14.2.5	Immunodetektion	44
2.15	Transiente Genexpression in <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i>	45
2.15.1	Kultivierung und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
2.15.2	Tabakinfiltration	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Die Identifizierung von Kandidatengenen für Effektoren von <i>M. oryzae</i>	48
3.1.1	Microarray Studie zur Identifizierung putativer Effektorkandidaten.....	48
3.1.2	Auswahl von <i>MoHEGs</i> (<i>Magnaporthe oryzae</i> Hypothetical Effector Genes).....	50
3.1.3	Transkriptabundanzanalysen der <i>MoHEGs</i> durch RT-qPCR	53
3.1.3.1	Expressionsanalyse in <i>in vitro</i> gekeimten Konidien	55
3.2	Funktionale Analyse von <i>MoHEGs</i> durch Gen-Deletion.....	56
3.2.1	Generierung von Deletionsmutanten in <i>M. oryzae</i>	57
3.2.2	Funktionale Analyse von <i>MoHEG16</i>	58
3.2.2.1	Genotypische Analyse der $\Delta moheg16$ KO-Mutanten	58
3.2.2.2	Phänotypische Analyse der $\Delta moheg16$ KO-Mutanten.....	59
3.2.3	Funktionale Analyse von <i>MoHEG18</i>	63
3.2.3.1	Genotypische Analyse der $\Delta moheg18$ KO-Mutanten	63
3.2.3.2	Phänotypische Analyse der $\Delta moheg18$ KO-Mutanten.....	64
3.3	Der Einfluss von <i>MoHEGs</i> auf MoNLP vermittelten Zelltod	67
3.3.1	Untersuchung von <i>Magnaporthe</i> -spezifischen Zelltodinduktoren	67
3.3.1.1	Untersuchung der Zelltod induzierenden Wirkung der MoNLPs	68
3.3.1.2	Expression von MoNLPs während der Wirtinteraktion mit Gerste.....	70
3.3.2	Zelltodassay mit <i>MoHEGs</i>	71
3.3.2.1	Zelltod unterdrückende Wirkung von Frühen <i>MoHEGs</i>	71
3.3.2.2	Zelltod induzierende Wirkung von Späten <i>MoHEGs</i>	72
3.3.2.3	Zelltodunterdrückende Wirkung von Späten <i>MoHEGs</i>	74
3.4	Untersuchung von <i>MoHEG</i>-Orthologen in <i>M. grisea</i>	76
3.4.1	Cytologische Untersuchungen der Interaktion zwischen <i>Magnaporthe</i> und der Fingerhirse (<i>D. sanguinalis</i>)	76
3.4.2	Analyse von Effektorkandidaten aus <i>M. grisea</i> Isolat BR29	80
3.4.2.1	Die Interaktion zwischen <i>M. grisea</i> Isolat BR29 und der Gerstensorte Nigrate	81
3.4.2.2	Transkriptabundanzanalysen der <i>MgHEGs</i> durch RT-qPCR	83

3.4.3	Untersuchung der Zelltod induzierenden Wirkung von MgNLPs	86
3.5	MoNUDIX als potenzieller Pathogenitätsfaktor	89
3.5.1	NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung <i>Magnaporthe</i>	89
3.5.2	Expression von MoNUDIX während Pathogen-Wirt-Interaktion.....	91
3.5.3	Funktionale Analyse von <i>MoNUDIX</i>	92
3.5.3.1	Verifizierung der Transformanden	93
3.5.3.2	Makroskopische Analyse der <i>MoNUDIX</i> Transformanden.....	95
3.5.3.3	Mikroskopische Analyse der <i>MoNUDIX</i> Mutanten	98
3.5.3.4	Zelltodassay in <i>N. benthamiana</i> und <i>N. tabacum</i>	100
4	DISKUSSION	102
4.1	Identifizierung von Effektorkandidaten in <i>Magnaporthe oryzae</i>	102
4.1.1	Nur Frühe MoHEGs werden <i>in planta</i> und <i>in vitro</i> exprimiert	105
4.1.2	MoHEG16 ist ein Virulenzeffektor	106
4.1.3	Orthologe Gene der <i>MgHEGs</i> und <i>MoHEGs</i> sind ähnlich reguliert	109
4.2	MoNLP1, MoNLP2 und MoNLP4, sowie MgNLP1, MgNLP3 und MgNLP4, induzieren Zelltod in <i>N. benthamiana</i>	110
4.2.1	MoHEG13 unterdrückt den MoNLP-vermittelten Zelltod	112
4.3	MoNUDIX fördert die Virulenz von <i>M. oryzae</i> in Gerste.....	114
4.4	Fazit	116
5	LITERATURVERZEICHNIS	118
6	DANKSAGUNG	128
7	LEBENS LAUF.....	130
8	ANHANG	132

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lebenszyklus der <i>Pyriculariaceae</i>	3
Abbildung 2: Das Plasmid pSilentDual1	19
Abbildung 3: Das Plasmid pB7WG2.....	20
Abbildung 4: Expressionsprofilen der <i>MoHEGs</i>	54
Abbildung 5: Relative Transkriptakkumulation der <i>MoHEGs</i> in <i>in vitro</i> gekeimten Sporen	55
Abbildung 6: <i>MoHEGs</i> mit Y/F/WxC Motiv	56
Abbildung 7: Vorgehensweise zur Erzeugung von Deletionsmutanten in <i>M. oryzae</i>	57
Abbildung 8: PCR zur genotypischen Verifizierung der $\Delta moheg16$ -Mutanten.....	59
Abbildung 9: Kategorien zur mikroskopischen Auswertung der Interaktion zwischen <i>M. oryzae</i> (Isolat 70-15 Wildtyp bzw. $\Delta moheg16$) und der Gerstensorte Vada.....	61
Abbildung 10: Makroskopische und mikroskopische Analyse des Phänotyps von $\Delta moheg16$ während der Interaktion mit der Gerstensorte Vada.....	62
Abbildung 11: PCR zur Verifizierung der $\Delta moheg18$ KO-Mutanten.....	64
Abbildung 12: Kategorien zur lichtmikroskopischen Auswertung der Interaktion zwischen <i>M. oryzae</i> (Isolat 70-15 Wildtyp bzw. $\Delta moheg18$) und der Gerstensorte Vada	65
Abbildung 13: Makroskopische und mikroskopische Analyse des Phänotyps von $\Delta moheg18$ während der Interaktion mit der Gerstensorte Vada.....	66
Abbildung 14: Proteinsequenzen der MoNLPs und ChNLP	68
Abbildung 15: Analyse der Zelltod induzierenden Wirkung der MoNLPs durch <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> (A.t.) vermittelte transiente Transformation	69
Abbildung 16: Expressionsprofile von <i>MoNLP1</i> und <i>MoNLP4</i>	71
Abbildung 17: Zelltod unterdrückende Wirkung Früher <i>MoHEGs</i>	72
Abbildung 18: Zelltod induzierende Wirkung Später <i>MoHEGs</i>	73
Abbildung 19: Zelltod unterdrückende Wirkung Später <i>MoHEGs</i>	75
Abbildung 20: Makroskopische und mikroskopische Analyse der Interaktion zwischen <i>Digitaria</i> <i>sanguinalis</i> und dem <i>M. oryzae</i> Isolat TH6772 bzw. dem <i>M. grisea</i> Isolat BR29.....	79
Abbildung 21: Makroskopische und mikroskopische Analyse der Interaktion zwischen dem <i>M.</i> <i>grisea</i> Isolat BR29 und der Gerstensorte Nigrate.....	82
Abbildung 22: Erstellen von Expressionsprofilen der <i>MgHEGs</i> durch RT-qPCR	84
Abbildung 23: Relative Transkriptakkumulation der <i>MgHEGs</i> in <i>in vitro</i> gekeimten Sporen	85
Abbildung 24: Analyse der Zelltod induzierenden Wirkung der <i>MgNLPs</i> durch <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> (A.t.) vermittelte transiente Transformation	87
Abbildung 25: NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung <i>Pyricularia</i>	90
Abbildung 26: Expressionsprofile von <i>MoNUDIX</i> und <i>BR29NUDIX1</i> während Pathogen-Wirt- Interaktion	92
Abbildung 27: Southern Blot Analyse der <i>MoNUDIX</i> Mutanten	93
Abbildung 28: Transkriptabundanz von <i>MoNUDIX</i> in Wildtyp und <i>MoNUDIX</i> Mutanten	94
Abbildung 29: Wachstum der <i>MoNUDIX</i> Transformanden auf verschiedenen Nährmedien.....	95
Abbildung 30: Infektionsphänotyp von <i>M. oryzae</i> 70-15 wt und <i>MoNUDIX</i> Überexpressionsmutanten auf Gerste und Reis	97
Abbildung 31: Infektionsphänotyp von <i>M. oryzae</i> 70-15 wt und <i>MoNUDIX</i> Silencingmutanten auf Gerste und Reis.....	97
Abbildung 32: Kategorien der lichtmikroskopischen Auswertung der Interaktion zwischen <i>M.</i> <i>oryzae</i> Isolat 70-15, wt bzw. den <i>MoNUDIX</i> Mutanten und der Gerstensorte Vada	99
Abbildung 33: Lichtmikroskopische Analyse der Interaktion zwischen <i>M. oryzae</i> 70-15 bzw. den <i>MoNUDIX</i> Überexpressions- und Silencingmutanten. mit der Gerstensorte Vada.....	100
Abbildung 34: Transiente Expression von <i>MoNUDIX</i> in <i>N. tabacum</i> und <i>N. benthamiana</i>	101

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Primer für die quantitative PCR	15
Tabelle 2: Primer für die Herstellung von KO-Konstrukten	17
Tabelle 3: Primer für die transiente Genexpression in <i>N. benthamiana</i> oder <i>N. tabacum</i>	17
Tabelle 4: Primer für die Herstellung von Sonden für den Southern Blot.....	18
Tabelle 5: Liste der <i>M. oryzae</i> Hypothetical Effector Genes (<i>MoHEGs</i>).	52
Tabelle 6: <i>MgHEGs</i> im Vergleich zum entsprechenden Ortholog aus <i>M. oryzae</i> (<i>MoHEG</i>).	81
Tabelle 7: Liste der <i>MgHEG</i> Transkriptsequenzen	132
Tabelle 8. Liste verwendeter Chemikalien	133
Tabelle 9: Liste verwendeter Enzyme.....	133
Tabelle 10. Liste verwendeter Geräte	133
Tabelle 11: Liste verwendeter Kits	134
Tabelle 12: Liste verwendeter Software.....	134
Tabelle 13: Liste sonstiger Labormaterialien	134

IV. ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation
Aq _{reinst}	Reinstwasser
AS	Aminosäure
att	attachment
AVR	Avirulenz
BAS	biotrophy-associated secreted
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>
BNS	biotrophy-necrotrophy-switch
bp	Basenpaare
CC-NB-LRR	coiled-coil nucleotide-binding-leucine-rich-repeats
cDNA	complementary DNA
ChEC3	<i>C. higginsianum</i> effector candidate 3
CM	complete medium
cm	Zentimeter
C _T	cycle threshold
DA	<i>Digitaria</i> -Agar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EHIM	extra-haustorial membrane compartment
et al.	et alii, und andere
ETI	effector triggered immunity
ETS	effector triggered susceptibility
f. sp.	forma specialis
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
<i>gpd</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
h p.i.	hours post inoculation
<i>hph</i>	hygromycin B phosphotransferase gene
HR	Hypersensitive Reaktion
HSA	Haferflocken-Stärke-Agar
IH	invasive Hyphen
KO	knock-out
L	Liter
LB	lysogeny broth
M	Mol
MAMP	microbe-associated molecular pattern
min	Minute
<i>MoHEG</i>	<i>M. oryzae</i> Hypothetical Effector Gene
MTI	MAMP-triggered immunity
n.d.	nicht detektiert
NLP	Nep1 [necrosis- and ethylene-inducing protein]-like protein

NLS	nuclear localization signal
NPP1	necrosis-inducing <i>Phytophthora</i> protein 1
PCD	programmed cell death
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PRR	pattern recognition receptor
R	Resistenz
RBA	Reisblattagar
RLKs	receptor-like kinase
RLPs	receptor-like protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RP27	Ribosomales Protein 27
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTA	relative Transkriptabundanz
RT-RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
RxLR	Arginin, eine beliebige Aminosäure, Leucin und Arginin
s	Sekunde
SP	Signalpeptid
ssp	Subspecies
T3E	Typ III Effektoren
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TALE	transcription activator-like effektor
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T_m	annealing temperature
<i>TrpC</i>	tryptophan C gene
UTR	untranslated region
VE-Aq.	vollentsalztes Wasser
VIR	Virulenz
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein
Y/F/WxC	Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, eine beliebige Aminosäure, Cystein

V. SUMMARY

Phytopathogenic fungi of the genus *Pyricularia* are associated with the plant family *Poaceae*. While major crop plants like rice, barley or wheat can be infected by *P. oryzae* (morph *Magnaporthe oryzae*), these plants are protected against isolates of the species *P. grisea* (morph *Magnaporthe grisea*) or *P. penniseticola* by nonhost resistance. Nonhost resistance is defined as the capacity of an entire plant species to resist infection by all isolates of a given microbe species. To successfully infect host plants, phytopathogens secrete effector molecules to circumvent or manipulate the plant immune system. The repertoire of effectors therefore contributes to host range of a pathogen. To analyze differences in effector repertoires of host and nonhost isolates from barley, transcriptomes of the *M. oryzae* isolate TH6772 and of the *P. penniseticola* isolate CD180 were compared during their interaction with barley by microarray analysis. Based on this approach, transcripts encoding small secreted effector proteins were identified that accumulate to a significantly higher extent during host interaction of barley with *M. oryzae* [designated ***M. oryzae* Hypothetical Effector Genes (MoHEGs)**] than during nonhost interaction with *P. penniseticola*.

Analyses of transcript abundances during host interaction between *M. oryzae* and barley (0-96 h p.i.) showed that *MoHEGs* are differentially expressed during biotrophic interaction. Furthermore they can be differentiated into two groups according to their maximum transcript abundances (prior to or during penetration: *EarlyMoHEGs* or during colonization: *LateMoHEGs*). In contrast to *LateMoHEGs*, early-induced *MoHEGs* with expression maximum at 0 and 6 h p.i. were also transcribed during plant-independent *in vitro* germination of conidia. Functional analysis disclosed a crucial function for *EarlyMoHEG16* during barley infection as mesophyll cell collapse was significantly reduced in barley host plants infected with three independent *Δmoheg16* mutants compared to barley inoculated with the corresponding *M. oryzae* wild type isolate. Hence, although *MoHEG16* mutation does not cause complete loss of *M. oryzae* virulence on barley, *MoHEG16* constitutes a *M. oryzae* virulence factor. Additionally, *LateMoHEG13* was found to suppress *M. oryzae*-Nep1 (**N**ecrosis- and **E**thylene-inducing **P**rotein**1**)-Like Protein (**MoNLP**)-derived cell death in *N. benthamiana*. For that reason *MoHEG13* may play a role in coordination of cell death induction by the fungus in general or possibly regulate other NLP-mediated responses during *M. oryzae* infection processes.

Furthermore, putative orthologs to *MoHEGs* were identified in *M. grisea* isolate BR29 (*MgHEGs*) that showed a similar, *MoHEG*-like expression pattern during a compatible interaction. Although direct evidence has yet to be provided, these data indicate that HEG effectors might be similarly

deployed by both species for successful host infection, thereby being part of an evolutionary conserved fungal infection strategy.

Apart from *MoHEGs* another putative pathogenicity factor of *M. oryzae* was analyzed for its function in the *M. oryzae* - barley interaction. The NUDIX hydrolase MoNUDIX was functionally characterized by over-expression and silencing of the corresponding gene(s). Quantitative microscopic analysis of the mutants revealed that over-expression accelerates infection process whereas down-regulation of the gene seems to restrict pathogenic growth. MoNUDIX therefore represents a so far unknown pathogenicity factor in *M. oryzae*.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Phytopathogene Pilze der Gattung *Pyricularia* sind mit Pflanzen aus der Familie der Süßgräser assoziiert. Während einige der weltweit bedeutendsten Nahrungsmittelpflanzen, wie Reis, Weizen oder Gerste von Isolaten der Art *P. oryzae* (morph *Magnaporthe oryzae*) infiziert werden können, sind dieselben Pflanzen vor Infektionen von Isolaten der Arten *P. grisea* (morph *Magnaporthe grisea*) oder *P. penniseticola* durch Nichtwirtresistenz geschützt. Nichtwirtresistenz ist definiert als die Resistenz einer Pflanzenart gegenüber allen Pathotypen einer Pathogenart. Um Pflanzen erfolgreich infizieren zu können, sekretieren Phytopathogene so genannte Effektoren um die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen oder zu manipulieren. Das Repertoire an Effektormolekülen eines Pathogens dient demzufolge als eine Art Schlüssel, der Zugang zu Wirtspflanzen vermittelt. Um das spezifische Effektorrepertoire verschiedener Arten der Gattung *Pyricularia* zu untersuchen, wurde in einer Microarray-Analyse das Transkriptom des *M. oryzae* Isolats TH6772 mit dem des *P. penniseticola* Isolats CD180 während Wirt- bzw. Nichtwirtinteraktion mit Gerste (*Hordeum vulgare*) vergleichend analysiert. Auf diese Weise konnten Effektor-kandidatengene identifiziert werden, die differenziell in der Wirtinteraktion exprimiert werden und für kleine, sekretierte Proteine kodieren, so genannte *MoHEGs* (*M. oryzae* Hypothetical Effector Genes).

Durch Transkriptabundanzanalysen während des gesamten Interaktionsverlaufes (0-96 h p.i.) zwischen *M. oryzae* und Gerste wurde deutlich, dass *MoHEGs* ausschließlich während der biotrophen Phase des Lebenszyklus des Pathogens exprimiert werden. Innerhalb dieser können sie in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, je nachdem, ob sie ein Expressionsmaximum vor und während der Penetration (Frühe *MoHEGs*) oder während der Kolonisierung der Wirtspflanze (Späte *MoHEGs*) aufwiesen. Transkripte Früher *MoHEGs* können, im Gegensatz zu Späten *MoHEGs*, auch in *in vitro* gekeimten Konidien detektiert werden, d.h. Frühe *MoHEGs* sind auch unabhängig von der Pflanzeninteraktion induziert. Funktionale Analyse zeigte, dass dem Frühen MoHEG16 eine wichtige Rolle während der Wirtinteraktion zukommt. Mikroskopische Analyse dreier unabhängiger $\Delta moheg16$ Mutanten zeigte signifikant weniger kollabiertes Mesophyllgewebe in Gerste nach 72 h p.i. im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp. MoHEG16 stellt folglich einen Virulenzeffektor dar, durch dessen Verlust die Virulenz des Pathogens deutlich abgeschwächt wird. Desweiteren wurde untersucht, ob Späte *MoHEGs* den *M. oryzae*-Nep1 (Necrosis- and Ethylene-inducing Protein1)-Like Protein (MoNLP) vermittelten Zelltod in *N. benthamiana* unterdrücken können. Dabei stellte sich heraus, dass MoHEG13 eine solche Zelltod suppressierende Eigenschaft besitzt und somit möglicherweise MoNLP vermittelte Funktio-

nen, die in der *M. oryzae* - Gerste Interaktion von Bedeutung sind, beeinflussen kann oder tatsächlich an einer generellen Koordination von Zelltodmechanismen beteiligt sein könnte.

Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Wirt- bzw. Nichtwirtinteraktion zwischen *D. sanguinalis* und *M. grisea* bzw. *M. oryzae* cytologisch charakterisiert. Es wurden putative Orthologe zu den *MoHEGs* in *M. grisea* identifiziert (*MgHEGs*) und deren Expression während einer kompatiblen Interaktion untersucht. Es stellte sich heraus, dass in fast allen Fällen orthologe Effektorkandidaten beider Arten ähnlich reguliert sind, d.h. es kann spekuliert werden, dass deren Expression einem innerhalb der Gattung *Pyricularia* konservierten Infektionsmechanismus zu Grunde liegt.

Neben den *MoHEGs* wurde auch die Rolle von *MoNUDIX* als potenzieller Pathogenitätsfaktor oder Effektor in *M. oryzae* während Interaktion mit Gerste untersucht. Bei der funktionalen Analyse von *MoNUDIX* durch Überexpression und „Silencing“ stellte sich durch quantitative mikroskopische Analyse heraus, dass eine Überexpression des Gens den Infektionsverlauf im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp beschleunigt bzw. konnten Hinweise erhalten werden, dass die Reduktion der Transkriptmenge des Gens das pathogene Wachstum beeinträchtigt. *MoNUDIX* kann somit, wie *MoHEG16*, als Virulenzeffektor bezeichnet werden.

1 EINLEITUNG

Die durch *Pyricularia oryzae* (morph *Magnaporthe oryzae*) ausgelöste Pflanzenkrankheit „rice blast“ kommt in 85 verschiedenen Ländern vor und verursacht jährliche Verluste in der Reisernte von 10-35 % (Talbot, 2003; Fisher et al., 2012). Da Reis das Grundnahrungsmittel der Hälfte der Weltbevölkerung darstellt und damit als wichtigste Anbaupflanze weltweit gilt (Khush, 2005), wurde diese Pflanzenkrankheit 2012 in einem weltweiten Ranking als bedrohlichste pilzliche Krankheit eingestuft (Dean et al., 2012). Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Interaktion zwischen *M. oryzae* und seinen Wirtspflanzen zu Grunde liegen, kann helfen den durch das Pathogen entstehenden Schaden zu verringern.

1.1 Pilze der Familie *Pyriculariaceae*

Pyricularia oryzae wird der Gattung *Pyricularia*, der Familie der *Pyriculariaceae* und der Ordnung *Magnaporthales* innerhalb der filamentösen Ascomyceten zugeordnet und kommt unter natürlichen Bedingungen ausschließlich in der anamorphen Lebensform vor (Ebbole, 2007; Klaubauf et al., 2014), unter Laborbedingungen ist allerdings auch geschlechtliche Vermehrung möglich. In der gegenwärtigen Literatur ist der Name der sich sexuell vermehrenden Lebensform, *Magnaporthe oryzae*, allerdings gebräuchlicher, weswegen er auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. *M. oryzae* ist in der Lage sämtliche oberirdische Teile der Wirtspflanze zu befallen, darunter Blätter, Stängel und Rispen (Mentlak et al., 2011). Hier können typische spindelförmige Blastsymptome mit hellem Zentrum und nekrotischem Rand ausgebildet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Wurzeln infiziert werden können (Sesma and Osbourn, 2004; Jansen et al., 2006).

Mit Reis (*Oryza sativa*) assoziierte *M. oryzae* Isolate befallen nur sehr wenige andere Pflanzenarten, darunter Gerste (*Hordeum vulgare*) (Ou, 1985; Kato et al., 2000; Klaubauf et al., 2014). Allerdings zählen zur selben Art auch Isolate, die mit anderen Wirtspflanzen wie Weizen, Mais oder anderen, nicht domestizierten Gräsern wie beispielsweise Fingerhirse (*Eleusine coracana*) oder Liebesgras (*Eragrostis curvula*) assoziiert sind. Eine zweite Art innerhalb der *Pyriculariaceae*, *Pyricularia grisea* (morph *Magnaporthe grisea*), wurde bereits 2002 (Couch and Kohn) durch genealogische Untersuchungen verschiedener Genloci und Kreuzungsexperimente von *M. oryzae* separiert und umfasst Isolate, die u.a. pathogen auf *Digitaria*-Arten sind. Durch weitere Analysen konnten 2014 (Klaubauf et al.) zusätzliche Arten innerhalb der *Pyriculariaceae* differenziert

werden, darunter *Pyricularia penniseticola*, zu welcher hauptsächlich die Wirtspflanze *Pennisetum* (Lampenputzergras) infizierende Isolate gehören.

Die Lebensweise von *M. oryzae* ist hemibiotroph, d.h. der Lebenszyklus kann in zwei verschiedene Phasen eingeteilt werden. Während der Pilz in der biotrophen Lebensphase von der lebenden Wirtszelle abhängig ist, zehrt er in der nekrotrophen Lebensphase von totem Gewebe (Abbildung 1). Eine Infektion beginnt mit einer Konidiospore, die mit einem Klebstoff aus Mannose und Glykoproteinen an der Blattoberfläche haftet (Abbildung 1 B) (Hamer et al., 1988; Ebbole, 2007). Die Konidiospore keimt an einer oder zwei ihrer drei Zellen mit einem Keimschlauch aus, der in eine adhäsive extrazelluläre Matrix eingebettet ist (Abbildung 1 C) (Xiao et al., 1994). Am Ende des Keimschlauchs differenziert sich ein kuppelförmiges Appressorium aus, dessen Zellwand reich an Chitin ist und eine dünne Schicht Melanin an der inneren Zellwandseite besitzt (Abbildung 1 D) (Talbot, 2003). Der programmierte Zelltod (Autophagie) der Konidienzellen ist dabei für die Appressorienreifung von entscheidender Bedeutung (Kershaw and Talbot, 2009). Im Inneren des Appressoriums wird schließlich durch Anreicherung osmotisch wirksamer Substanzen ein hoher Druck von ungefähr 8,19 MPa aufgebaut (Loehrer et al., 2014) und dadurch mittels eines Penetrationskeils die pflanzliche Kutikula und Zellwand durchstoßen (Abbildung 1 E). Beim invasiven Wachstum bleibt der Pilz außerhalb der pflanzlichen Plasmamembran und wird von dem extra-haustoriellen Membran Kompartiment (EHIM) umgeben (Kankanala et al., 2007; Mosquera et al., 2009). Die invasiven Hyphen sind blasig ausgeformt und werden mit der Aufnahme von Nährstoffen aus der Pflanzenzelle in Verbindung gebracht (Ebbole, 2007; Wilson and Talbot, 2009). Sind die primär infizierten Wirtszellen komplett mit invasiven Hyphen gefüllt, wachsen sie über Plasmodesmata in Nachbarzellen (Kankanala et al., 2007). Mit der Verbreitung in benachbarte Zellen wird die biotrophe Lebensphase des Pilzes beendet, denn die in den Nachbarzellen differenzierten, dünnen, invasiven Hyphen besitzen einen nekrotrophen Charakter. Nach etwa 4-7 Tagen kommt es schließlich zu makroskopisch sichtbaren Blastsymptomen. Die Konidienbildung geschieht an einfachen Konidiophoren innerhalb der Symptome (Ebbole, 2007). An ihnen gebildete Konidiosporen werden durch Regenspritzer oder Wind weiterverbreitet, womit der Zyklus geschlossen wird (Abbildung 1 A) (Talbot, 2003).

Pflanzliche Zellen besitzen verschiedenen Möglichkeiten dem Angriff eines Pathogens zu begegnen. Zur Abwehr einer Penetration, kann eine angegriffene Zelle beispielsweise eine lokale Zellwandapposition an der Angriffsstelle ablagern (Zeyen et al., 2002; Luna et al., 2011). Sie wird allgemein als Papille bezeichnet und stellt eine strukturelle Barriere für den Angreifer dar. Eine Papille besteht dabei vorwiegend aus Callose und Lignin (Aist, 1976; Underwood, 2012). Gerste

bildet Papillen während der Interaktion mit sämtlichen Isolaten der Gattung *Pyricularia* aus, wobei sie während der Interaktion mit nicht adaptierten Isolat (s. 1.3) häufiger zu beobachten sind (Zellerhoff et al., 2006; Delventhal et al., 2014). Gelingt es einem Pathogen trotz Papille die Zelle zu penetrieren, kann diese durch eine so genannte Hypersensitive Reaktion absterben, d.h. ein induziertes Zelltodprogramm durchlaufen (PCD, engl. Programmed Cell Death) (Green, 1998; Bozhkov and Lam, 2011). Durch PCD kann biotrophen Pathogenen die Lebensgrundlage entzogen werden, weswegen PCD als Abwehrreaktion zu bewerten ist (Heath, 2000b; Hückelhoven, 2007). Da *Pyricularia* zu Beginn einer Wirtkolonisierung auf lebendes Zellgewebe angewiesen ist, stellt der PCD auch gegen Pilze dieser Gattung eine Abwehrreaktion dar. Auch der PCD kann sowohl in der Wirt- als auch in der Nichtwirtinteraktion von *Pyricularia* beobachtet werden, jedoch tritt diese Abwehrreaktion gegen Nichtwirtsolarte schneller und häufiger auf (Faivre-Rampant et al., 2008; Delventhal et al., 2014).

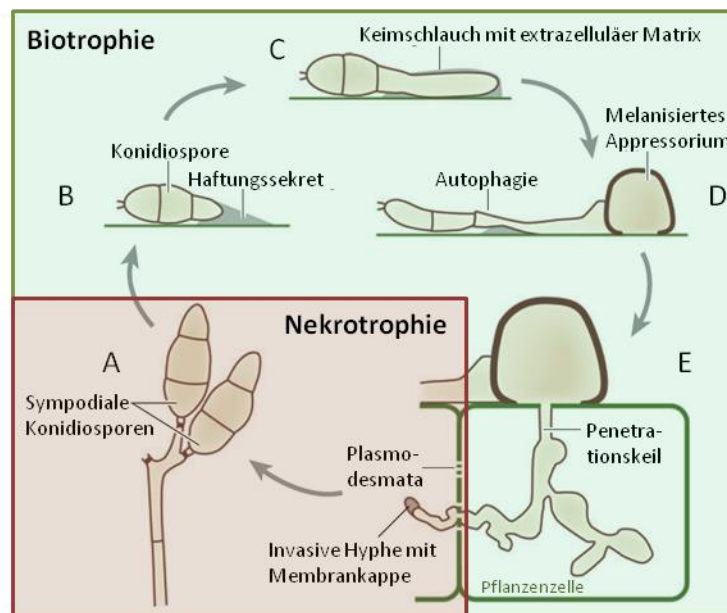


Abbildung 1: Lebenszyklus der *Pyriculariaceae*. Die zwei unterschiedlichen Phasen des Lebenszyklus sind farblich verschieden hervorgehoben (grün, biotrophe Lebensphase; rot, nekrotrophe Lebensphase). Für die detaillierte Erläuterungen (A-E) s. Text, verändert nach Ebbole (2007).

1.2 Das pflanzliche Immunsystem

Das Immunsystem von Vertebraten basiert auf einer angeborenen Immunabwehr für die ersten, unspezifischen Abwehrantworten und einer adaptiven Immunabwehr für spezifischere Abwehrreaktionen und das immunologische Gedächtnis. Der Organismus wird in letztem Fall mit Hilfe spezialisierter Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems gegen mikrobielle Angriffe

verteidigt. Im Gegensatz dazu gründet das pflanzliche Immunsystem auf dem angeborenen Immunsystem jeder einzelnen Zelle des Organismus (Nürnberger et al., 2004).

Das pflanzliche, angeborene Immunsystem ist zweischichtig und wird mit einem Zick-Zack-Modell beschrieben (Jones and Dangl, 2006). Dabei sind die verschiedenen Ebenen aufeinander folgend, da ihre Existenz dem evolutionären „Wettrüsten“ zwischen Pathogen und Wirt zu Grunde liegt.

Die erste Ebene des Zick-Zack-Modells beschreibt die Erkennung konservierter struktureller Komponenten eines Pathogens, welche als MAMPs (engl. Microbe-Associated Molecular Patterns), oder früher gebräuchlicher als PAMPs (engl. Pathogen-Associated Molecular Patterns), bezeichnet werden. Pilzliche Pathogene können verschiedene MAMPs wie Chitin, β -1,3-Glukan oder Ergosterol besitzen. Entsprechend wird die erste Stufe der pflanzlichen Immunantwort MTI (engl. MAMP-Triggered Immunity) genannt. MAMPs werden auf dieser Ebene von so genannte PRRs (engl. Pattern Recognition Receptors) erkannt, wodurch eine basale Immunantwort ausgelöst wird (Boller and Felix, 2009). PRRs sind transmembrane Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs, engl. Receptor-Like Kinases) oder Rezeptor-ähnliche Proteine (RLPs, engl. Receptor-Like Proteins), wobei das Vorhandensein von extrazellulären Bindedomänen die Erkennung der MAMPs im Apoplasten vermittelt (Zipfel and Felix, 2005). Zu den bekannten PRRs in Reis gehören beispielsweise das transmembrane Glykoprotein CEBiP (engl. Chitin Elicitor Binding Protein) und die Rezeptorkinase OsCERK1 (engl. *Oryza sativa* Chitin Elicitor Receptor Kinase 1), welche beide für das Perzipieren des Chitins und auch für die Induktion von MTI in Reis essenziell sind (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010).

Die zweite Ebene des pflanzlichen Immunsystems wird von pathogen-spezifischen Effektoren vermittelt, durch die ein Pathogen die MTI überwinden oder manipulieren konnte. Diesen Fall bezeichnet man als ETS (engl. Effector-Triggered Susceptibility). Kann ein solcher pathogen-spezifischer Effektor innerhalb der Wirtszelle erkannt werden und eine spezifischere und effektivere Immunantwort induzieren, wird diese Ebene wiederum als ETI (engl. Effector-Triggered Immunity) bezeichnet. ETI führt entsprechend zur Resistenz der Pflanze, d.h. zur Avirulenz (AVR) des Pathogens. ETI induzierende Effektoren werden aus diesem Grund auch als AVR-Effektoren bezeichnet. Vermittelt wird die Erkennung der Avirulenzeffektoren durch Resistenz(R)-Proteine. Nach der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1971) existiert zu jedem AVR-Protein ein korrespondierendes R-Protein, wobei die Erkennung des Avirulenzeffektors auch indirekt erfolgen kann (Van Der Biezen and Jones, 1998; Dangl and Jones, 2001). Die meisten ETI-Rezeptoren (R-Proteine) agieren intrazellulär und werden der konservierten Familie der NB-LRR-Proteine (engl. Nucleotide-Binding, Leucine-Rich-Repeats) zugeordnet (Van Der Biezen and

Jones, 1998). Kann das R-Protein, z.B. durch eine Mutation des korrespondierenden AVR-Effektors, diesen nicht (mehr) erkennen, ist das Pathogen wiederum virulent (VIR). Das Zick-Zack-Modell kann sich entsprechend weiter fortsetzen, indem Pathogen-spezifische Effektoren und Wirt-spezifische Proteine miteinander konkurrieren und der evolutionäre Verlauf fortschreitet.

Klassische AVR-Effektoren und korrespondierende R-Proteine sind aus der *M. oryzae*-Reis-Interaktion bereits bekannt. Ein prominentes Beispiel ist AVR-Pita. Es kodiert für eine sekretierte Metalloprotease und interagiert direkt mit dem korrespondierenden Reisprotein Pi-ta, welches den CC-NB-LRR Proteinen zugeordnet wird (Bryan et al., 2000; Jia et al., 2000). Durch diese direkte Erkennung wird die Resistenz von R-Protein exprimierenden Reissorten gegen AVR-Pita sekretierende *M. oryzae* Isolate vermittelt. Es kommt also hier zu einer so genannten Rassen-Sorten-spezifischer Wirtresistenz, bei der eine bestimmte Reissorte gegen ein spezifisches *M. oryzae* Isolat resistent ist.

1.3 Nichtwirt-Resistenz

Ist eine Pflanzen-Art gegenüber allen genotypischen Variationen einer Pathogen-Art resistent, bezeichnet man diese Resistenz als Nichtwirt-Resistenz (Heath, 2000a). Die Nichtwirt-Resistenz ist die am weitesten verbreitete und stabilste Form der Resistenz und umfasst konstitutive Barrieren und induzierbare Mechanismen (Heath, 2000a; Thordal-Christensen, 2003; Mysore and Ryu, 2004).

Zu den konstitutiven Barrieren der Nichtwirt-Resistenz werden z.B. die Wachsschicht auf der Blattoberfläche, eine widerstandsfähige Zellwand oder die Anwesenheit antimikrobieller Enzyme oder Sekundärmetabolite gezählt. Wird durch konstitutive Barrieren eine generelle Inkompatibilität zwischen dem Pathogen und dem putativen Wirt vermittelt, ist eine spezifische Aktivierung von Abwehrmechanismen nicht notwendig. Kann das Pathogen allerdings die konstitutiven Barrieren überwinden, muss es durch die putative Wirtzelle an der Plasmamembran als „nicht selbst“ erkannt werden, denn nur so können Abwehrreaktionen induziert werden. Eine solche Erkennung erfolgt über „generelle Elicitoren“ bzw. MAMPS (s. 1.2) und ist damit Teil des angeborenen Immunsystems (Nürnberger et al., 2004). Die Abwehrmechanismen, die bei einer Nichtwirtinteraktion induziert werden unterliegen komplexer genetischer Kontrolle und scheinen je nach co-evolutionärer Interaktionszeit zwischen Pathogen und Wirt sowie Pathosystem verschiedenartig zu sein (Heath, 2001; Heath, 2002).

Eine Differenzierung zwischen Nichtwirt- und Rassen-Sorten-spezifischer Wirtresistenz ist allerdings anhand einer spezifischen Abwehrreaktion allein nicht möglich, da Wirt- und Nichtwirtpathogene sich in vielen Fällen denselben induzierbaren Abwehrmechanismen gegenüber sehen (Thordal-Christensen, 2003; Tsuda and Katagiri, 2010). D.h., dass sowohl PRR- als auch NB-LRR-spezifische Immunabwehr (MTI und ETI) an induzierbaren Nichtwirtresistenzmechanismen beteiligt sein können. Postuliert ist, dass der Anteil an NB-LRR-vermittelter Immunantwort mit phylogenetischer Verwandtschaft zwischen Wirt- und Nichtwirtpflanze steigt (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011).

Durch die Etablierung von Virulenz-vermittelnden Effektoren durch einzelne Pathogen-Isolate kann jedoch auch die Nichtwirt-Resistenz einer Pflanze überwunden werden und damit eine neue, kompatible Pathogen-Wirt-Interaktion möglich machen. Das Pathogen erweitert in einem solchen Fall entsprechend sein Wirtspektrum (engl. host range expansion), wobei alte und neue Wirtpflanzenart häufig phylogenetisch nah verwandt sind (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011). Anschließend kann es innerhalb einer gewissen co-evolutionären Phase erneut zu einer Spezialisierung des Pathogens an den neuen Wirt kommen. Die Möglichkeit zur Etablierung auf einer neuen Wirtpflanze und die damit verbundene Überwindung der Nichtwirt-Resistenz durch einzelne, dominante Gene ist allerdings auch möglich, wenn alte und neue Wirtpflanze phylogenetisch weiter entfernt verwandt sind (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011). Hier wäre entsprechend der Anteil der PRR-vermittelten Abwehr an der Nichtwirtresistenz höher. Solche sogenannten Wirtsprünge (engl. host jumps) wurden z.B. bei Rostpilzen nachgewiesen (Roy, 2001; van der Merwe et al., 2008).

Bei Pilzen der Gattung *Pyricularia* ist die Wirtpflanzen-Spezifität die Regel (Kato et al., 2000) und wird von wenigen dominanten Genen bestimmt. So wird z.B. vermutet, dass ein einziges Gen für die Pathogenität von *M. oryzae* gegenüber *Avena sativa* (Hafer) (Oh et al., 2002) und drei Loci für die Pathogenität gegenüber *Triticum aestivum* (Weizen) verantwortlich sind (Tosa et al., 2006). Ein anderes Beispiel für die durch wenige dominante Gene vermittelte Wirtpflanzen-spezifität ist der Effektor PWL2 (engl. Pathogenicity toward Weeping Lovegrass), welcher Resistenz von *M. oryzae* gegenüber der Wirtpflanze *Eragrostis curvula* (engl. Weeping Lovegrass, schwachgekrümmtes oder afrikanisches Liebesgras) vermittelt (Sweigard et al., 1995). Es sind keine PWL Homologe in anderen filamentösen Ascomyceten bekannt, womit diese Proteinfamilie als *Magnaporthe*-spezifisch gilt (Kang et al., 1995). Der Einfluss dieser einzelnen Wirt-Spezifitäts-Gene ähnelt dem Wirken von spezifischen Effektoren auf der Ebene der NB-LRR-abhängigen Immunantwort (ETI), die im Zuge der Spezialisierung zwischen Pathogen und Wirt zum Tragen kommt (1.2). Die Vermittlung der Wirtpflanzen-Spezifität auf Ebene der ETI konnte sogar eindeutig ge-

zeigt werden, was ein weiteres Beispiel innerhalb der Gattung *Pyricularia* zeigt. So wird angenommen, dass der Verlust des Gens *AVR-CO39* eines mit *Setaria italica* (Fuchsschwanzhirse) assoziierten Isolates, die Kolonisierung von Reis möglich machte, da das korrespondierende *NB-LRR-Gen (R-Gen) Pi-CO39* in alten Reissorten verbreitet war (Couch and Kohn, 2002; Couch et al., 2005). Auch dieser Locus ist *Magnaporthe*-spezifisch und etablierte sich in der frühevolutionären Phase der Gattung (Tosa et al., 2005).

Für das Wirtsspektrum eines Pathogens sind Effektoren also von ausschlaggebender Bedeutung (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011). Sie spielen entsprechend sowohl eine Rolle in der Nichtwirtresistenz als auch in der Rassen-Sorten-spezifischen Wirtresistenz und stellen die „pathogenen Waffen“ im evolutionär gesteuerten Wettrüsten der Pathogen-Wirt-Interaktion dar.

1.4 Effektoren

Pathogene sekretieren zahllose kleine Moleküle, die Wirtszellen manipulieren um eine Infektion zu erleichtern. Diese Effektoren können die Physiologie der Wirtszelle zu Gunsten des Pathogens verändern und/oder die Immunabwehr der Zelle unterdrücken oder abschwächen (Virulenzeffektoren). Auf der anderen Seite können sie aber auch durch spezifische Proteine innerhalb des Wirtes erkannt werden, Abwehrreaktionen induzieren und sogar die Wirtspflanzen-Spezifität bestimmen (Avirulenzeffektoren, s. auch 1.3). Damit nehmen sie eine Schlüsselfunktion bei der Etablierung einer kompatiblen Pathogen-Wirt-Interaktion ein. Allgemein handelt es sich entsprechend um „von mit Pflanzen assoziierten Organismen sekretierte Moleküle, die Wirtzellstrukturen und -funktionen verändern“ (Hogenhout et al., 2009).

Phytopathogene gram-negative Bakterien besitzen ein so genanntes Typ III Sekretionssystem (T3SS) um Effektoren mittels einer „molekularen Spritze“ direkt in ihre Wirtszellen zu injizieren (Galán et al., 2014). Sie werden im Folgenden als Typ III Effektoren (T3Es) bezeichnet. Eine Klasse von bakteriellen T3Es sind die so genannten TAL- (Transcription Activator-Like) Effektoren (TALEs). Sie sind natürlich vorkommende DNA bindende Proteine aus den phytopathogenen *Xanthomonas spp.* und *Ralstonia solanacearum*. TALEs besitzen eine DNA-bindende Domäne, bestehend aus einer variablen Anzahl von 34-Aminosäure-Modulen (zwischen 1,5 und 33,5 Modulen), ein C-terminales Zellkernlokalisierungsmotiv (NLS, engl. nuclear localization signal) und eine typische Aktivierungsdomäne, wie sie bei Transkriptionsfaktoren vorkommt (Deslandes and Rivas, 2012). TALEs fungieren entsprechend als Transkriptionsfaktoren und binden an Promotorregionen innerhalb des Wirtgenoms und manipulieren die Transkription.

Dabei bindet jedes 34-Aminosäure-Modul eines TALEs an ein Basenpaar innerhalb der Ziel-DNA-Sequenz (TAL-Box) (Boch et al., 2009; Moscou and Bogdanove, 2009). Auf Grund dieses strikten Codes können auch künstlich generierte TALEs für Anwendungen im Bereich der Gentechnik (engl. genome engineering) eingesetzt werden (Scholze and Boch, 2010).

Im Gegensatz zu Bakterien haben phytopathogene Oomyceten und Pilze kein direktes Injektionssystem um Effektoren in die Wirtszelle zu translokalisieren. So müssen Effektoren entsprechend mindestens die pilzliche sowie die pflanzliche Plasmamembranen passieren. Im Vergleich zu allen anderen Effektoren, besitzen solche aus Oomyceten ein charakteristisches Motiv aus vier Aminosäuren: RxLR (Arginin, eine beliebige Aminosäure, Leucin und Arginin), das die Translokation des Effektors in die Wirtszelle vermittelt (Whisson et al., 2007a; Birch et al., 2008). Viele dieser RxLR-Effektoren besitzen zusätzlich ein dEER-Motiv (doppelt Glutaminsäure und Arginin) innerhalb der ersten 25 Aminosäuren hinter dem RxLR (Whisson et al., 2007a). Unklar ist aber weiterhin, ob die Translokation von Effektoren über eine Pathogen- oder eine Wirtszellen-spezifische Transportmaschinerie abgewickelt wird. Allerdings sind mehrere Studien veröffentlicht, die einen Pathogen-unabhängigen Translokationsprozess, auch für Effektoren echter Pilze, zeigen (Dou et al., 2008a; Kale et al., 2010; Rafiqi et al., 2010; Ribot et al., 2013).

Motive, die Effektorproteine höherer Pilze charakterisieren oder gar deren Translokation vermitteln sind kaum bekannt bzw. nicht bestätigt. Eine erste Orientierungshilfe bietet das Y/F/WxC Motiv, das in echtem Mehltau (*Bgh*, *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Haustorien-ausbildenden Rostpilzen (*Pgt*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*; *Pt*, *Puccinia triticina*) identifiziert wurde, die *Poaceae* (Süßgräser) infizieren (Godfrey et al., 2010; Spanu et al., 2010). Bei Analyse des haustoriellen Transkriptom von *Bgh* besaßen 19 % aller vorhergesagten Proteine dieses Motiv innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem Signalpeptid (Godfrey et al., 2010). Es ist interessant, dass dieses Motiv sowohl in einem Ascomycet und als auch in einem Basidiomycet identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wird spekuliert, dass das Motiv durch konvergente Entwicklung der beiden Pathogene während ihrer Interaktion mit Wirtspflanzen innerhalb der Familie der Süßgräser etabliert wurde (Godfrey et al., 2010). Auch wenn der Translokationsmechanismus bislang ungeklärt ist; dass Effektoren höherer Pilze sekretiert und transloziert werden, konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden (Kemen et al., 2005; Khang et al., 2010; Rafiqi et al., 2010; Djamei et al., 2011).

In *Colletotrichum higginsianum* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Effektorsekretion bereits vor der Penetration stattfindet, da bestimmte ChECs (engl. *C. higginsianum* Effector Candidates) nur in Appressorien vor der Penetration detektiert werden konnten (Kleemann et al., 2012). Das zeigt, dass ein molekularer Austausch zwischen Pathogen und Pflanze auch schon

in sehr frühen Stadien der Interaktion stattfindet und neben invasiven auch extrazelluläre Strukturen für die Sekretion von Effektormolekülen verantwortlich sein können.

Die Funktionen, die Effektorproteine schließlich innerhalb und außerhalb der Wirtszelle erfüllen sind mannigfaltig. Ein Beispiel wie Effektoren die pflanzliche Abwehr manipulieren können findet sich bei *Cladosporium fulvum*. Der Erreger der Braunfäule auf Tomate sekretiert zwei verschiedene Effektoren (Avr4 und Ecp6), die durch die Bindung von Chitin dessen Perzeption durch die Wirtspflanze manipulieren (de Jonge et al., 2010). Beide Effektoren sind demnach Chitin-bindend, allerdings bindet Avr4 langkettige und Ecp6 kurzkettige Chitin-Oligosaccharide. Ein weiteres Beispiel für Chitin-bindende Effektoren findet sich auch bei *M. oryzae*. Slp1 bindet ebenfalls Chitin-Oligosaccharide über eine LysM-Domäne und unterdrückt so ebenfalls Chitin-induzierte Immunabwehr, d.h. PTI, in Reis (Mentlak et al., 2012). Damit ist Slp1 einer der wenigen bekannten Virulenzeffektoren aus *M. oryzae*.

1.4.1 Redundante Funktionen verschiedener Effektoren innerhalb desselben Effektorrepertoires

Durch funktionale Analyse von Effektorgenen konnte festgestellt werden, dass nicht jeder einzelne Effektor einen großen Beitrag zu Virulenz oder Fitness eines Pathogens leistet. Da Deletionen einzelner Effektoren oft einen zu geringen Effekt haben, um nachgewiesen werden zu können, muss davon ausgegangen werden, dass mehrere Effektoren ähnliche, entsprechend redundante, oder auch additive Funktionen innerhalb einer Wirtszelle besitzen (Stergiopoulos and de Wit, 2009).

Ein prominentes Beispiel für die Redundanz von Effektoren ist innerhalb des *P. syringae* – *Arabidopsis thaliana* Pathosystems zu finden. RIN4 (RPM1-Interacting Protein 4) ist ein in der Plasmamembran von *A. thaliana* verankertes Protein, das eine Schlüsselfunktion in der pflanzlichen Immunabwehr einnimmt, indem es als negativer Regulator basaler Immunabwehr (PTI) gilt (Kim et al., 2005b). Aus diesem Grund stellt RIN4 das gemeinsame Zielprotein gleich dreier *P. syringae* T3Es (AvrRpm1, AvrB und AvrRpt2) dar. Durch eine Hyperphosphorylierung durch AvrRpm1 und AvrB wird der RIN4-Komplex in einem Stadium stabilisiert, das die PTI negativ reguliert (Mackey et al., 2002), AvrRpt2 dagegen kann den RIN4-Komplex eliminieren, wodurch die entstehenden Spaltprodukte vermutlich die positive Regulierung der basalen Immunabwehr induzieren (Kim et al., 2005a; Afzal et al., 2011). Ein anderes Beispiel aus dem gleichen Modellsystem zeigt, dass Effektoren aus dem gleichen Organismus auch an verschiedenen Stellen bestimmter mit Abwehr assoziierter Signalwege angreifen können. Die beiden *P. syringae* Ef-

fektoren AvrPtoB und AvrPto interagieren beispielsweise mit der Kinasedomäne des Immunrezeptors FLS2, wodurch die Detektion des bakteriellen PAMPs flg22, d.h. PTI, reglementiert wird (Göhre et al., 2008; Xiang et al., 2008). AvrHopF2 greift im gleichen Signalweg ein, indem es die flg22 Perzeption durch Interaktion mit verschiedenen MAP-Kinase-Kinasen unterdrückt, die nachfolgend der flg22 Perzeption fungieren (Wang et al., 2010; Wu et al., 2011).

Redundanzen von Effektorfunktionen werden auch bei filamentösen Pathogenen diskutiert. Innerhalb der Oomyceten existiert ebenfalls ein außerordentliches Potenzial für funktionale Redundanz (Birch et al., 2008). Innerhalb der Genome von *P. sojae*, *P. ramorum*, *H. parasitica* und *P. infestans* konnten jeweils hunderte RxLR-Effektoren identifiziert werden, die Familien zuzuordnen sind, die zahllose Paraloge aufweisen (Tyler et al., 2006; Whisson et al., 2007b; Win et al., 2007). Ein konkretes Beispiel sind die Paraloge Avh6 und Avh32 aus *P. sojae* (Wang et al., 2011). Der Vorteil dabei scheint zu sein, dass nach der Erkennung einzelner Effektoren durch R-Proteine, auf diese ohne große Verluste an Pathogenität verzichtet werden kann (Birch et al., 2008; Stergiopoulos and de Wit, 2009). Auch bei *M. oryzae* werden Redundanzen im Effektorrepertoire vermutet (Mentlak et al., 2011).

Einen weiteren Hinweis darauf, dass die Etablierung verschiedener Effektoren mit ähnlichen oder additiven Funktionen sinnvoll für ein Pathogen sind, lieferte die Generierung eines systematischen Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk von Effektorkandidaten des Ascomyceten *Golovinomyces orontii*, des Oomyceten *Hyaloperonospora arabidopsidis* und des phytobathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* mit Wirtproteinen aus *Arabidopsis thaliana* (Mukhtar et al., 2011; Weßling et al., 2014). Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl intra- als auch interspezies-spezifische Überschneidungen, und damit konvergente Entwicklung, bezogen auf Angriffsziele von Effektoren existieren. Das lässt vermuten, dass die Interaktion von Effektoren mit bestimmten Zielproteinen oder Signalwegen eines Wirtes von evolutionärem Vorteil für ein Pathogen sein kann. Um diese Vorteile abzusichern, wären Redundanzen innerhalb des Effektorrepertoires einer Pathogenart sinnvoll.

1.4.2 Effektoren und deren Translokation in *Magnaporthe oryzae*

Innerhalb des *Magnaporthe*-Reis-Pathosystems sind bereits einige Effektoren bekannt (Valent and Khang, 2010). Genauer gesagt, sind so gut wie alle bekannten *M. oryzae* Effektoren AVR-Effektoren. Die exakten Funktionen konnten allerdings nur von wenigen von ihnen enthüllt werden. Die prominentesten Beispiele für AVR-Effektoren aus *M. oryzae* sind Avr-Pita, Avr-Pia, Avr-Pik/km/kp, Avr-Piz-t und Avr-CO39 (Jia et al., 2000; Yoshida et al., 2009; Kanzaki et al.,

2012; Césari et al., 2013) und erst kürzlich wurde ein weiterer AVR-Effektor, Avr-Pi9, identifiziert (Wu et al., 2015). Durch die Identifizierung korrespondierender, Pflanzensortenspezifischer R-Proteine innerhalb von Wirtszellen, wird davon ausgegangen, dass auch diese AVR-Effektoren in die Wirtszelle sekretiert werden, da nur so eine Interaktion von AVR-Effektor und R-Protein möglich ist. Für andere *M. oryzae* Effektoren (BAS1, PWL1 und PWL2 [1.3]) wurde die Translokation in die Wirtszelle durch Fusion mit fluoreszierenden Proteinen direkt gezeigt (Khang et al., 2010).

Die Abgabe einer Art von *Magnaporthe* Effektoren geschieht über eine spezialisierte Struktur, den so genannten BIC (engl. Biotrophic Interfacial Complex) (Mosquera et al., 2009). Der BIC wird an der Spitze der ersten invasiven Penetrationshyphe gebildet und bleibt schließlich am Rand der ersten blasigen Hyphenzelle bestehen, bis angrenzende Zellen kolonisiert werden (Mosquera et al., 2009; Khang et al., 2010). Werden Nachbarzellen befallen, wird auch dort ein BIC an der Spitze der ersten invasiven Hyphe etabliert, wobei der primäre BIC inaktiv wird (Mosquera et al., 2009). Der BIC stellt eine membranreiche Struktur dar, die interessanterweise aus pflanzlichem Material abgeleitet werden kann (Giraldo et al., 2013). Das heißt, dass Effektoren, die innerhalb des BIC beobachtet werden können, bereits durch den Pilz sekretiert wurden. BIC-lokalisierte Effektoren, können schließlich im Cytoplasma der Wirtszelle detektiert werden, weswegen sie auch cytoplasmische Effektoren genannt werden (Khang et al., 2010; Giraldo and Valent, 2013). Das Lokalisationssignal für die BIC-Lokalisation wird innerhalb der Promotorsequenz der Effektorgene vermutet (Khang et al., 2010). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass BIC-lokalisierte Effektoren durch ein anderes Sekretionssystem translokalisiert werden, als solche die über die EIHM (engl. Extra Invasive Hyphae Membrane) sekretiert werden und innerhalb des Kompartiments zwischen pilzlicher und pflanzlicher Plasmamembran verbleiben (Giraldo et al., 2013). Letztere werden EIHM-Kompartiment-lokalisierte Effektoren oder auch apoplastische Effektoren genannt und bilden damit eine zweite Art von *Magnaporthe* Effektoren (Giraldo and Valent, 2013). Darüber hinaus wurde eine dritte Art von *Magnaporthe* Effektoren beschrieben, für die gezeigt werden konnte, dass sie zunächst innerhalb des Kompartiments zwischen pilzlicher und pflanzlicher Plasmamembran akkumuliert und anschließend trotzdem innerhalb der Wirtszelle nachgewiesen werden kann (Ribot et al., 2013). Folglich scheint sich die Abgabe von Effektoren in *M. oryzae* über verschiedene Wege etabliert zu haben.

1.5 Andere putative Pathogenitätsfaktoren

1.5.1 NLPs

NLPs (engl. Nep1 [Necrosis- and Ethylene-inducing Protein]-Like Proteins) sind eine weit verbreitete Proteinfamilie. Sie sind sowohl in Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien, als auch in Pilzen und Oomyceten vertreten, wobei die meisten NLP besitzenden Organismen Pflanzenpathogene darstellen (Gijzen and Nürnberger, 2006). Die besondere Eigenschaft dieser Proteine ist die Zelltod induzierende Wirkung in zweikeimblättrige Pflanzen, die zunächst für das Protein Nep1 (engl. Necrosis- and Ethylene-inducing Protein) aus *Fusarium oxysporum*, das auch Namensgeber der Proteinfamilie ist, festgestellt wurde (Bailey, 1995). Neben der typischen Nekrose, induzieren NLPs auch die Produktion von Ethylen, einem Phytohormon, das die Ausprägung von Nekrosen verstärken kann (Bailey et al., 1990). Die für NLPs charakteristische Domäne wurde nach NPP1, einem NLP aus *Phytophthora parasitica*, benannt (PFAM Domäne PF05630) (Fellbrich et al., 2002) und beinhaltet ein konserviertes Heptapeptid, GHRHDWE. Darüber hinaus besitzen die meisten NLPs ein Signalpeptid, weswegen ihr Wirkort außerhalb der Zelle zu vermuten ist (Qutob et al., 2002; Qutob et al., 2006). Generell können drei verschiedene Haupttypen von NLPs unterschieden werden: Typ 1, Typ 2 und Typ 3 (Oome and Van den Ackerveken, 2014). Typ 1- und Typ 2-NLPs können cytotoxische Eigenschaften haben, unterscheiden sich aber in der Anzahl konservierter Cysteinreste innerhalb der NPP1-Domäne, wobei Typ 1-NLPs zwei und Typ 2-NLPs vier Cysteinreste besitzen (Gijzen and Nürnberger, 2006). Typ 3 dagegen kommt nur in Ascomyceten vor und besitzt keine cytotoxische Eigenschaft (Oome and Van den Ackerveken, 2014). Interessanterweise besitzen Oomyceten nur Typ 1-NLPs (Subtyp 1a), darunter viele nicht-cytotoxische NLPs (Cabral et al., 2012; Oome and Van den Ackerveken, 2014). Der Mechanismus, wie NLPs Nekrosen induzieren, ist noch nicht genau verstanden, wobei entweder eine Stimulation des pflanzlichen Immunsystems zu programmiertem Zelltod oder eine direkte Zerstörung der Zellmembran vermutet wird (Gijzen and Nürnberger, 2006). Jedenfalls ist die cytotoxische Wirkung lichtabhängig und erfordert einen intakten Wirtmetabolismus (Qutob et al., 2006).

NLPs können für die Pathogenese eine wichtige Rolle spielen. Beispielsweise ist NLP_{Pcc} aus *Erwinia carotovora* essenziell für die Virulenz auf Kartoffelknollen (Mattinen et al., 2004). Allerdings wird eine essenzielle Rolle von NLPs für die Virulenz von mehreren Pilzen ausgeschlossen, da der Verlust einzelner NLP Gene oft keinen Einfluss auf diese hat (Cuesta Arenas et al., 2010; Zhou et al., 2012; Santhanam et al., 2013). Jedoch ist hier auch funktionale Redundanz in Betracht zu ziehen, da die Organismen aus diesen Studien mehrere NLP Gene besitzen. Es wurde auch bereits ein NLP aus einem phytopathogenen Organismus beschrieben, der wie *M. oryzae*

einkeimblättrige Wirtpflanzen besitzt: MgNLP aus *Mycosphaerella graminicola* (Motteram et al., 2009). *M. graminicola* besitzt nur ein einziges NLP und die Deletion des Gens hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Virulenz, allerdings wird das Gen während der kompatiblen Interaktion mit Weizen exprimiert (Motteram et al., 2009).

Innerhalb des Genoms von *M. oryzae* befinden sich vier für NLPs kodierende Gene, wobei alle vier Gene ein Signalpeptid besitzen (Gijzen and Nürnberger, 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass Nep1_{M_o} bestimmte Abwehrreaktionen in *N. benthamiana* induziert (Zhang et al., 2012), jedoch fehlt eine Charakterisierung der cytotoxischen Eigenschaften der *M. oryzae* NLPs (MoNLPs) bis zu diesem Zeitpunkt.

1.5.2 NUDIX Hydrolasen

NUDIX-Hydrolasen spielen bei fast allen Klassen der Organismen wichtige Rollen in der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten, *di*-Nukleosidpolyphosphaten, Nukleotidzucker, RNA mit Cap-Struktur und *di*-Nukleotid-Coenzymen (Bessman et al., 1996; Mildvan et al., 2005). NUDIX Hydrolasen katalysieren dabei eine nukleophile Substitution am Phosphatrest, wobei die Anzahl zweiwertiger Kationen variiert, die für die jeweilige Reaktion benötigt werden (Mildvan et al., 2005). NUDIX-Hydrolasen gelten als so genannte „housecleaning enzymes“, d.h. sie können toxische Metabolite eliminieren und die Bereitstellung von Intermediaten für bestimmte Signal- und Stoffwechselwege kontrollieren (Bessman et al., 1996). Entsprechend sind die Funktionen von NUDIX-Hydrolasen mannigfaltig, sie regulieren beispielsweise posttranskriptionale Modifikationen, Ca²⁺-Ionenkanäle, Aktivierung von Alkoholdehydrogenasen oder den ERK-Signalweg (McLennan, 2006). Damit gehören sie zu Enzymen, die in wichtige regulatorische Prozesse im Zellmetabolismus katalysieren.

Die NUDIX Hydrolase aus *Colletotrichum truncatum* (CtNUDIX) besitzt ein Signalpeptid und wird unmittelbar vor dem Wechsel von biotropher zu nekrotropher Phase (BNS, engl. biotrophy-necrotrophy-switch) innerhalb des Lebenszyklus dieses Linsenpathogens exprimiert. Darüber hinaus verursacht die Überexpression von *CtNUDIX* einen HR ähnlichen Zelltod in infizierten Wirtzellen (Bhadauria et al., 2013). Aus diesem Grund wurde *CtNUDIX* mit dem Signal des BNS in Verbindung gebracht, womit diese NUDIX Hydrolase eine wichtige Rolle in der Pathogenese einnehmen würde. Weiterhin wurde postuliert, dass diese Klasse sekretierter NUDIX Hydrolasen hemibiotrophen, pilzlichen und pilz-ähnlichen Phytopathogenen vorbehalten sei und damit eine neue Effektorklasse innerhalb dieser Gruppe bilden würde (Bhadauria et al., 2013).

NUDIX Hydrolasen sind auch in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* charakterisiert. Innerhalb des Genoms konnten 29 putative *Arabidopsis* NUDIX Hydrolasen und einige ihrer Substrate identifiziert werden (Kraszewska, 2008). Interessanterweise ist die Induktion des für eine NUDIX-Hydrolase (AtNUDT7) kodierenden Gens von den regulatorischen Pflanzenabwehr-Genen *EDS1* (engl. Enhanced Disease Susceptibility 1) und *PAD4* (engl. PhytoAlexin Deficient 4) abhängig (Bartsch et al., 2006). Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass NUDIX-Hydrolasen in Pathogen-Wirt- Interaktionen wichtige Aufgaben zukommen können.

1.6 Ziele

In der vorliegenden Studie sollten molekulare Mechanismen, die Wirt- und Nichtwirtinteraktion zwischen Pilzen der Gattung *Pyricularia* und Gerste zu Grunde liegen, analysiert werden. Dieser molekularen Analyse ging ein Microarrayexperiment voraus, bei dem das Transkriptom aus dem *M. oryzae* Isolat TH6772 und dem *P. penniseticola* Isolat CD180 während der Interaktion mit Gerste vergleichend analysiert wurde (Delventhal, Dissertation 2015). Hierbei konnten Effektor kandidatengene identifiziert werden, die differenziell in *M. oryzae* während der Wirtinteraktion mit Gerste exprimiert werden. Schwerpunkt der hier vorliegenden, daran anschließenden Analyse sollte die Charaktersistierung von ausgewählten Effektor kandidatengenen aus *M. oryzae* (MoHEGs) durch *in vivo* und *in vitro* Transkriptabundanzanalysen mit quantitativer RT-PCR, funktionale Analyse durch gezielten Gen-Deletion und schließlich durch transiente Zelltodassays sein.

Im Rahmen des transienten Zelltodassays in dem Modellorganismus *N. benthamiana* sollten die vier in *M. oryzae* vorhandenen NLPs (MoNLPs) zunächst auf Zelltod induzierende Eigenschaften in *N. benthamiana* untersucht werden, um anschließend ausgesuchte MoHEGs auf die Fähigkeit untersuchen zu können diesen MoNLP vermittelten Zelltod zu unterdrücken.

In einem zweiten Teilprojekt sollte eine NUDIX Hydrolase aus *M. oryzae* (MoNUDIX) ebenfalls auf ihre Rolle als Pathogenitätsfaktor oder Effektor während der Wirtinteraktion mit Gerste untersucht werden. Dabei sollten ebenfalls Transkriptabundanzanalysen und eine funktionale Analyse angewendet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Ausführliche Tabellen verwendeter Chemikalien, Geräte, Kits, Enzyme, Software sowie aller sonstiger Labormaterialien befinden sich im Anhang.

2.1 Verwendete Oligonukleotide

Verwendete Oligonukleotide (Primer) für den Einsatz in die PCR wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) oder Biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 1: Primer für die quantitative PCR

Gen	Primernamen	Sequenz
<i>Moα-Tubulin</i>	Mo_aTub_for1	ACCACATTGGAGCACTCTGAC
	Mo_aTub_rev1	GTGATTGAGGAAACGACCTGA
<i>MoElongationsfaktor1</i>	Mo_EF1_for2	CAAGCTGAAGGGTATTGACCA
	Mo_EF1_rev2	TTGTCAAGAACCCAGGCATAC
<i>MoHEG1 (BAS3)</i>	Mo_BAS3_for	AAGCGCTGCCTTCAGATAAAC
	Mo_BAS3_rev	AACCATTGGCCTTCTCATTCT
<i>MoHEG2 (BAS4)</i>	Mo_BAS4_for	CGACAACAACAGTGCAGAGAA
	Mo_BAS4_rev	TCTCCAGATAGTGCAGTCGT
<i>MoHEG3</i>	Mo_02439_for	AATCTCTGGCACCACATTTTC
	Mo_02439_rev	GCCAAGGACAAAGAAGCAATC
<i>MoHEG4</i>	Mo_AMG08263qPCR_for	CGCCATGTCTTGTGTAAGTGA
	Mo_AMG08263qPCR_rev	CTCGCCATAATCAGACTCCTG
<i>MoHEG5</i>	Mo_AMG11831.2qPCR_for	AAGGTCGTCGACTGCAAGA
	Mo_AMG11831.2qPCR_rev	ACAGAGGGAGGCTTGGAGA
<i>MoHEG6</i>	Mo_HEG6_for	GTTGGAGCTGGAAGTGGAGA
	Mo_HEG6_rev	GAAGTCCGACCGAAACGAC
<i>MoHEG7</i>	Mo_HEG7_for	GCAGCTTAACGCAAACAAGAA
	Mo_HEG7_rev	GAGCATGTTGCATGTGATGAG
<i>MoHEG8</i>	Mo_HEG8_for	AAGACCGTCAAGAGCCTCAAG
	Mo_HEG8_rev	AAGACCGTCAAGAGCCTCAAG
<i>MoHEG9</i>	Mo_HEG9_for	GTTGCAGTAGGACGATCAAG
	Mo_HEG9_rev	CGTTGTTAACGCCCTTAGTCA
<i>MoHEG10</i>	Mo_HEG10_for	TCCTCACCGTCTTGTTCCTT
	Mo_HEG10_rev	GTGGCACCTCTGGACAGC
<i>MoHEG11</i>	Mo_HEG11_for	CGGGTACTCAACAACCCTTT
	Mo_HEG11_rev	GTAAGTAACGTCCCGGGTGTG
<i>MoHEG12</i>	Mo_HEG12_for	GAACCCACACGATCAAGACC
	Mo_HEG12_rev	TGAACATCGCAAGTCTTTGTG
<i>MoHEG13</i>	Mo_HEG13_for	CTCATCCCCTAGACAATGGTG
	Mo_HEG13_rev	TTGCACAAGGTGCATAGACTG

<i>MoHEG14</i>	Mo_HEG14_for Mo_HEG14_rev	AGACTGGGGTCTGACTGACAA GAACCAAAAGTGCCGATGTAG
<i>MoHEG15</i>	Mo_HEG15_for Mo_HEG15_rev	GTCAGGGCGAGCAGTTCAC ACCGATGCCAGAGCAGATAC
<i>MoHEG16</i>	Mo_HEG16_for2 Mo_HEG16_rev2	AGCTACGGGAGCAACATTGAC GATGTCAGTCAGGCCACAAC
<i>MoHEG17</i>	Mo_HEG17_for Mo_HEG17_rev	TGCGACAGGTTTCTATCCATC CGATGTTGCACTCGAAGTTG
<i>MoHEG18</i>	Mo_HEG18_for2 Mo_HEG18_rev2	GATACGATCACGGTCAAGCTG CGTTTTTGGTAAGCTTTTGA
<i>MgHEG1</i>	Mg_BR29HEG1_for Mg_BR29HEG1_rev	CTCAAATATGGGGTTCAGGAG GTTGGCTAGCTCGGTATTCAG
<i>MgHEG2</i>	Mg_BR29HEG2_for Mg_BR29HEG2_rev	CTTGACCTTCGGGGTAAATCC ATCGTGTGGCCTCATTATGCT
<i>MgHEG3</i>	Mg_BR29HEG3_for Mg_BR29HEG3_rev	AGCCTCGAGCTCAAAGATTGC AACCCCTCCGGATCAATAAGG
<i>MgHEG4</i>	Mg_BR29HEG4_for Mg_BR29HEG4_rev	GCCACACCGGTAATCTACAA CCGTGTTTCGCAAGATTGTTT
<i>MgHEG5</i>	Mg_BR29HEG5_for Mg_BR29HEG5_rev	TGGCAAGACCTACCCATCAC TCTTGCACTCAACAACCTTGG
<i>MgHEG7</i>	Mg_BR29HEG7_for Mg_BR29HEG7_rev	CAGTCCGGTGTGGTTATGGT CTGGACCAGGTTGGACGTAAG
<i>MgHEG8</i>	Mg_BR29HEG8_for Mg_BR29HEG8_rev	CGAGAACCAGCTGTCAAAGGA GATTTTCGCGCTTTGAATTGG
<i>MgHEG9</i>	Mg_BR29HEG9_for Mg_BR29HEG9_rev	CCGAGGCTTCTACGGATACGA GTCGGCCAAAGTCATCCAAAC
<i>MgHEG12</i>	Mg_BR29HEG12_for Mg_BR29HEG12_rev	GTTTTGTGACCAGCTGCAAGG TTGAGCAACCACCTGACCTTC
<i>MgHEG14</i>	Mg_BR29HEG14_for Mg_BR29HEG14_rev	AATGTTGGCGATGGTCCGTAT GCTCCGAGGTTACGGATGGTA
<i>MgHEG15</i>	Mg_BR29HEG15_for Mg_BR29HEG15_rev	ATCGCAGCTACCCTGGCTTT TGGTGAAGTCTGGCCTTG
<i>MgHEG16</i>	Mg_BR29HEG16_for Mg_BR29HEG16_rev	GTGGCATTTCCTTGGTCTCTG CGGTGCAGACTTTGCTGATAG
<i>MgHEG17</i>	Mg_BR29HEG17_for Mg_BR29HEG17_rev	TGCCCAACTTTGAGTGCAAC CTCAGCCTGTATCCGGTGTTC
<i>MgHEG18</i>	Mg_BR29HEG18_for Mg_BR29HEG18_rev	TGACAGTCCTTGTCCACCTTG TTCCAGTGGTGGATACCTCCT
<i>Mo_NUDIX</i>	Mo_NUDIX_F Mo_NUDIX_R	CCCGGAAAGCCTGGCTCA CCATCCAAACTTCACTCGTGC
<i>BR29NUDIX1</i>	BR29NDX1qPCR_F BR29NDX1qPCR_R	TGTAACAACAAAAGGCGAACC ATCCCTTCCAAATGTTTCCTG
<i>PWL2</i>	Mo_PWL2_qPCR_for Mo_PWL2_qPCR_rev	AGGAAGGGCTCGGAAGGCGA CATCCCGCGGATGTTGCCGT

<i>MoNLP1</i>	MGG_08454-NLP1_F2	GTCATCAACCACGATGCTGT
	MGG_08454-NLP1_R2	CAGCCGCTGAATACCTTGAG
<i>MoNLP4</i>	MGG_10532-NLP4_F	CACCATGACTACCCTCACCAA
	MGG_10532-NLP4_R2	AAAGTACTCGCACAGGACGTTG

Tabelle 2: Primer für die Herstellung von KO-Konstrukten

Gen	Primername	Sequenz
<i>hph</i>	uni-hyg F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACTGACCGGTGCCTGGATCTTC
	uni-hyg R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACGGTCGGCATCTACTCTATTCC
	HY	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
	YG	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA
	HygSondeVal_F	CGAAGAATCTCGTGCTTTCAG
	HygSondeVal_R	CGGCGAGTACTTCTACACAGC
<i>MoHEG16</i>	Mo_HEG16-5'UTR_for1	TCCCTATGGTAGTGGCATTGA
	Mo_HEG16-5'UTR_rev1	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGTTGAAACGCTTCCGAATA
	Mo_HEG16-3'UTR_for1	TCTGGAGTCTCACTAGCTTCGGACAATGCTGTTGTGTCTA
	Mo_HEG16-3'UTR_rev1	AGCCTGTTGATATCCGTTGTG
<i>MoHEG18</i>	Mo_HEG18-5'UTR_for	GCCTCTCATGAATATGGCAAG
	Mo_HEG18-5'UTR_rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAAGATTGAGCGGGTCTATGAT
	Mo_HEG18-3'UTR_for	TCTGGAGTCTCACTAGCTT TCTATTTCGCGGTGGTTATTTG
	Mo_HEG18-3'UTR_rev	TTTTCGATATTTGGCGTGGT

Tabelle 3: Primer für die transiente Genexpression in *N. benthamiana* oder *N. tabacum*. Konstrukte konnten mit und ohne Adapterprimer (Tabellenabschnitt A und B) generiert werden (s. Generierung von Konstrukten für die Gateway® Klonierung).

A mit Adapterprimern

Gen	Primername	Sequenz
	AdapterattB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	AdapterattB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
<i>MoNLP1</i>	Mo-NLP1-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCTTCCCAAGTTCTTCA
	Mo-NLP1-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTCATTGAAAACCTTGCC
<i>MoNLP2</i>	Mo-NLP2-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTCCCGAAGACCCAGAACA
	Mo-NLP2-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGCTACAACCTGCCACCGCTG
<i>MoNLP3</i>	Mo-NLP3-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGTTGGGCTTCAAATCCTT
	Mo-NLP3-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTTAGCCTTGGCTCGTAGC
<i>MoNLP4</i>	Mo-NLP4-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGTCATTTCGCCACCAT
	Mo-NLP4-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGCTATTGGGCGTTGTTGAGGT
<i>MoHEG1</i>	MoHEG1-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCAGTTCTCCACCGTCTC
	MoHEG1-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTTAGTGGGCACTGTTGGCAG
<i>MoHEG2</i>	MoHEG2-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCAGCTCTCATTCTCAGC
	MoHEG2-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGAGCAGGGGGATAGAC
<i>MoHEG5</i>	MoHEG5-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCAGTTCTCCGTCGCCG
	MoHEG5-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTTACAGGAGGGCGGCGAAG

<i>MoHEG7</i>	MoHEG7-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCAGTTCACCAACTCCTTC
	MoHEG7-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTTTAGTAGCCCTGAAGACGGAG
<i>MoHEG11</i>	MoHEG11-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCGGTCCCAAGCCCTC
	MoHEG11-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGCTAAGTGCTTTTAACTGGTCC
<i>MoHEG13</i>	MoHEG13-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCTTTCTCTCAAACCCCT
	MoHEG13-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGAGAACAACACGCTGGT
<i>MoHEG16</i>	MoHEG16-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCAGCTCCTGTTTGCTCTC
	MoHEG16-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTTAACTATATTGACGGATAAGGC
<i>MoHEG18</i>	MoHEG18-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCACCTCTGCATCTTTC
	MoHEG18-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGTTAAAAAGTAATAAAGGCTGG
<i>MoNUDIX</i>	Mo_NUDIX-attB1_F	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAAGTCTCTTTGTTTTATCTCACC
	Mo_NUDIX-attB1_R	AGAAAGCTGGGTGCTATCCTCGGGTGGCGG

B ohne Adapterprimer

Gen	Primername	Sequenz
<i>MoHEG3</i>	MoHEG3-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAATTCTCCACCCTCG
	MoHEG3-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACGGATCGCAATTAACCT
<i>MoHEG4</i>	MoHEG4-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGGCCTTGACGCTTT
	MoHEG4-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACCATTCGTCATCAGAAT
<i>MoHEG6</i>	MoHEG6-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAGTTCCTCGTCCGCCG
	MoHEG6-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACAGGAGGGCGGCGAAGC
<i>MoHEG9</i>	MoHEG9-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCGATTTTCAATTGCCT
	MoHEG9-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAGGATGGACCGATTT
<i>MoHEG10</i>	MoHEG10-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAACATCATTCTCCTACA
	MoHEG10-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACCCATCATCGCAGC
<i>MoHEG12</i>	MoHEG12-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCGCACCCTTCGATCGT
	MoHEG12-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAGTCGTCCCAAGGCAG
<i>MoHEG14</i>	MoHEG14-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCATATCGTCGCATTCATC
	MoHEG14-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATGGGGTCACCAAGTCG
<i>MoHEG17</i>	MoHEG17-attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTTTACAAACTCGCCGCCG
	MoHEG17-attB1_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATACTGGGGGTAGGCCGT

Tabelle 4: Primer für die Herstellung von Sonden für den Southern Blot

Resistenz	Primername	Sequenz
Hygromycin	HygSondeVal_F	CGAAGAATCTCGTGCTTTCAG
	HygSondeVal_R	CGGCGAGTACTTCTACACAGC
Geneticin	Mo_Geneticin_qPCR2_for	CAGGTTCTCCGGCCGCTTGG
	KanKasTermfor	TCCAGATTCGTCAAGCTGTTT

2.2 Verwendete Plasmid-DNA

2.2.1 pTK144

Das Plasmid pTK144 wurde von Thomas Kroj (INRA, UMR BGPI, Montpellier, Frankreich) zur Verfügung gestellt (Ribot et al., 2013) und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Überexpression von MoNUDIX in *M. oryzae* Isolat 70-15 verwendet (3.5.3). Es enthält neben einer Hygromycin-resistenz vermittelnden Expressionskassette für die Selektion in *M. oryzae*, den *Magnaporthe*-spezifischen und konstitutiven Promotor RP27 (Ribosomales Protein 27). Downstream dieses Promotors kann das Zielgen mit dem Restriktionsenzym SpeI innerhalb des Leserahmens in den Vektor kloniert werden. Zur Klonierung und Selektion in *E. coli* enthält das Plasmid eine Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase).

2.2.2 pSilentDual1

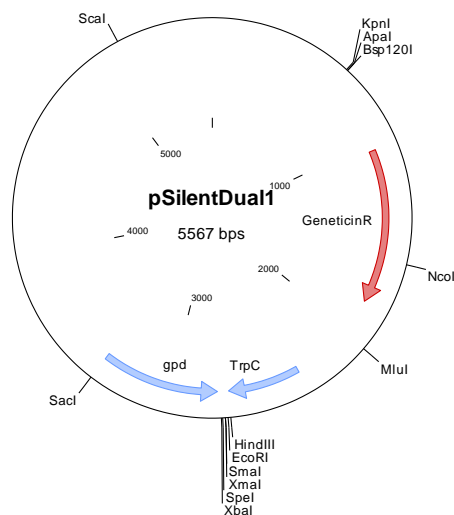


Abbildung 2: Das Plasmid pSilentDual1. Das Plasmid enthält zwei gegenläufige Promotoren aus *Aspergillus nidulans* (gpd und TrpC) und eine Geneticinresistenz vermittelnden Expressionskassette (GeneticinR) für die Selektion in *M. oryzae*.

Das Plasmid pSilentDual1 (Abbildung 2) dient dem Silencing von Genen in *M. oryzae* (Nguyen et al., 2008) und wurde in der vorliegenden Arbeit zum Silencing von MoNUDIX in *M. oryzae* Isolat 70-15 verwendet (3.5.3). Es enthält neben einer Geneticinresistenz vermittelnden Expressionskassette (GeneticinR) für die Selektion in *M. oryzae*, zwei gegenläufige Promotoren aus *Aspergillus nidulans* (gpd und TrpC). Zwischen den beiden Promotoren kann das Zielgen mit dem Restriktionsenzym SpeI in den Vektor kloniert werden. Zur Klonierung und Selektion in *E. coli* enthält das Plasmid eine Ampicillinresistenzgen (β -Lactamase).

2.2.3 pB7WG2

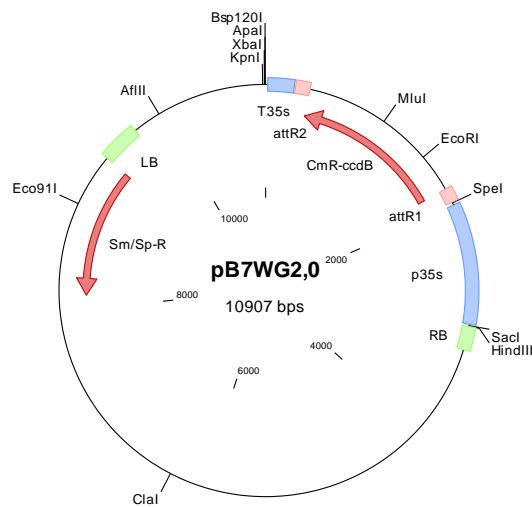


Abbildung 3: Das Plasmid pB7WG2. Das Plasmid enthält eine 35S-Promotor (p35s) und -Terminator (T35s) zur Expression in Tabak und eine Spectinomycin bzw. Streptomycin vermittelnden Expressionskassette (Sm/Sp-R) für die Selektion in *E. coli* und *A. tumefaciens*. Da es sich um einen Gateway®-Vektor handelt, ist er mit einer CmR-ccdB-Kassette zwischen den Att-Sites (attR1 und attR2) ausgestattet. Left und Right Border (LB und RB) begrenzen den Bereich der von *A. tumefaciens* ins Wirtgenom übertragen wird.

Zur transienten Genexpression in Tabak wurde das Plasmid pB7WG2 verwendet. Es wurde von Jochen Kleemann (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt (Kleemann et al., 2012) und in der vorliegenden Arbeit für die transiente Genexpression in Tabak verwendet (3.3.2). Bei pB7WG2 handelt es sich um einen Gateway®-kompatiblen Destinationvector (Endvektor, s. 2.12.6 unten), in dem die Expression des klonierten Gens unter der Kontrolle eines 35S-Promotors und -Terminators steht (Abbildung 3, p35s, T35s). Vor der LR-Reaktion (s. 2.12.6) liegt zwischen den att-sites die so genannte CmR-ccdB-Kassette vor, die in der LR-Reaktion gegen das Zielgen ausgetauscht wird. Die CmR-ccdB-Kassette besteht aus einem Chloramphenicol-Resistenz vermittelndem Gen (CmR) und einem Selbstmordgen (ccdB), dessen Produkt auf zur Klonierung verwendete *E. coli* Zellen toxisch wirkt. Zusätzlich liegt auf dem Vektor noch ein Streptomycin- bzw. Spectinomycinresistenz vermittelndes Gen (Sm/Sp-R) vor. Darüber hinaus besitzt pB7WGs die für eine *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transfektion von Tabak notwendige Right bzw. Left Border (RB bzw. LB). Der Abschnitt des Plasmids, der zwischen diesen beiden Bereichen liegt wird entsprechend von *A. tumefaciens* in das Tabakgenom übertragen (s. 2.15.1).

2.3 Verwendete Pilze und Pflanzen

2.3.1 Pilze der Gattung der *Pyricularia*

Das *M. oryzae* Isolat TH6772 wurde vom Institute of Biochemistry, Faculty of Agriculture (Tamagawa University, Machida-shi, Japan) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten *Pyricularia*-Isolate CD180 (*P. penniseticola*), BR29 (*M. grisea*) und US68 (70-15, *M. oryzae*) wurden vom Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD, Montpellier, Frankreich) erhalten.

2.3.1.1 Kultivierung zur Sporulationsinduktion

Alle verwendeten *Magnaporthe* Isolate wurden generell auf Haferflocken-Stärke-Agar (HSA) oder Kompletmedium (CM) bei konstanten 23 °C im Dunkeln kultiviert. Zur Sporulationsinduktion wurden je nach Isolat verschiedene Nährmedien verwendet. Für das *P. penniseticola* Isolat CD180 handelte es sich dabei um HSA, für das *M. grisea* Isolat BR29 wurde HSA oder *Digitaria*-Agar (DA) verwendet. Die *M. oryzae* Isolate TH6772 und 70-15 wurden dagegen auf Reisblattagar (RBA) zur Sporulation angeregt. Zur Sporulationsinduktion wurden unter sterilen Bedingungen mit bereits bewachsenen Agarblöckchen beimpfte Platten zunächst 24 Stunden im Dunkeln bei 23 °C inkubiert um das Anwachsen des Pilzes zu verbessern und anschließend unter einer Lichtbank mit Mischlicht aus Weißlicht und schwachem UV-Licht (Schwarzlicht, $\lambda = 310\text{-}360\text{ nm}$) bei 24 °C und einem 16 Stunden Licht-/8 Stunden Dunkel-Rhythmus gehalten. Nach 14 Tagen wurden die Sporen für eine Inokulation oder *in vitro* Keimung geerntet.

HSA (Haferflocken-Stärke-Agar)

Hefeextrakt	2	g L ⁻¹
Stärke	10	g L ⁻¹
Haferflocken	72	g L ⁻¹
Agar-Agar	20	g L ⁻¹

RBA (Reisblattagar)

Reisblätter	50	g L ⁻¹
Stärke	10	g L ⁻¹
Bierhefetablette	2	g L ⁻¹
Agar-Agar	15	g L ⁻¹

DA (Digitaria-Agar)

Digitaria- Blätter	50	g L ⁻¹
Stärke	10	g L ⁻¹
Bierhefetablette	2	g L ⁻¹
Agar-Agar	15	g L ⁻¹

CM (Komplettmedium)

20x Nitratsalze	50	mL
Spurenelemente	1	mL
D-Glucose	10	g
Pepton	2	g
Hefeextrakt	1	g
Caseinhydrolysat	1	g
Vitaminlösung	1	mL
Agar-Agar	15	g l ⁻¹

20x Nitratsalze

NaNO ₃	120	g
KCl	10,4	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10,4	g
KH ₂ PO ₄	30,4	g

Autoklavieren, bei 5 °C lagern

1000x Spurenelemente

Aq _{reinst}	80	mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,2	g
H ₃ BO ₃	1,1	g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,5	g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,17	g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,16	g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,15	g
NaEDTA	5	g

Komponenten in angegebener Reihenfolge zugeben, aufkochen, auf 60 °C abkühlen, pH 6,5 einstellen (KOH), auf RT abkühlen, auf 100 ml auffüllen

Vitaminlösung

Biotin	0,01	g
Pyridoxin	0,01	g
Thiamin	0,01	g
Riboflavin	0,01	g
PABA (<i>p</i> -Aminobenzoesäure)	0,01	g
Nikotinsäure	0,01	g
Aq _{reinst}	100	mL

Dunkel und bei 4 °C lagern

2.3.1.2 Kultivierung in Flüssigkultur

Für das Anlegen einer Flüssigkultur von Pilzen der Gattung *Pyricularia* wurde zunächst ein ca. 2 cm² großes, mit dem entsprechenden Isolat bewachsenes Agarblöckchen aus einer CM-Platte ausgestochen und zusammen mit 50 mL CM-Flüssigmedium (CM ohne Agar-Agar, s. 2.3.1.1) in einem Mixer (Waring® Blender) zerkleinert. Schließlich wurde die Kultur in einem 250 mL-Erlenmeyerkolben auf 150 mL aufgefüllt und ca. 40 Stunden bei 25 °C und 125 rpm inkubiert.

2.3.1.3 Herstellung von Dauerkulturen

Zur längerfristigen Konservierung wurden von allen verwendeten *Pyricularia* Isolaten Trockenkulturen angelegt. Dazu wurde ca. 0,5 cm x 0,5 cm große, autoklavierte Nylonmembran (Boehringer Mannheim) auf HSA-Platten ausgelegt, welche mit entsprechenden *Pyricularia* Isolaten bewachsenen Agarblöckchen beimpft wurden. Die Platten wurden schließlich bis zum vollständigen Bewachsen im Dunkeln inkubiert und anschließend die mit Mycel überwachsenen Nylonmembranstücke in einer sterilen Petrischale im Exsikkator getrocknet. Schließlich konnten die Nylonmembranstücke bei -20 °C gelagert werden. Für die Rekultivierung der Trockenkulturen wurde je ein Stückchen Nylonmembran auf eine HSA-Platte ausgelegt und nach Auswachsen als Stammkultur verwendet.

2.3.2 Versuchspflanzen

2.3.2.1 Gerste (*Hordeum vulgare*)

Für Inokulationsexperimente wurden die Sommergerstesorten Vada oder Ingrid verwendet. Das Saatgut wurde vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln) zur Verfügung gestellt. Von der Sorte Vada wurde eine eigene Nachzucht im Institut erzeugt.

Zur Anzucht wurden Gerstensamen auf feuchtem Filterpapier ausgelegt und über Nacht im geschlossenen Unterschrank im Dunkeln bei Raumtemperatur vorgekeimt. Anschließend wurden die Keimlinge in mit Erde des Typs ED73 (Balster Einheitserdewerk GmbH) gefüllte Plastiktöpfe (7x7x8 cm) ausgelegt und mit gesiebter ED73-Erde bedeckt. Die Töpfe wurden in mit Wasser gefüllte Tablettts gestellt und die Pflanzen in einer Phytokammer mit einem 16 Stunden Licht-/ 8 Stunden Dunkel-Rhythmus bei 18 °C und 65 % relativer Luftfeuchte aufgezogen. Nach 7 Tagen wurden die Primärblätter inokuliert.

2.3.2.2 *Digitaria sanguinalis*

Das Saatgut von *Digitaria sanguinalis* wurde von B&T World Seeds, Aigues-Vives, Frankreich bezogen.

Zur Anzucht wurden die Samen zunächst auf feuchtem Filterpapier ca. 5 Tage im Lichtschrank (Sanyo, 12 h Licht bei 24 °C und 12 h Dunkelheit bei 22 °C) in verschlossenen Petrischalen vorgekeimt. Anschließend wurden jeweils 5 Keimlinge auf mit Erde des Typs ED73 (Balster Einheitserdewerk GmbH) gefüllte Plastiktöpfe (7x7x8 cm) ausgelegt. Die Töpfe wurden in mit Wasser gefüllte Tablettts gestellt und die Pflanzen in einer Phytokammer mit einem 16 Stunden Licht-/ 8 Stunden Dunkel-Rhythmus bei 18 °C und 65 % relativer Luftfeuchte aufgezogen. Nach ca. einer Woche wurden die jungen Pflanzen in weitere Töpfe vereinzelt und nach zwei weiteren Wochen inokuliert.

2.3.2.3 *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum*

Saatgut von *N. benthamiana* stammte ursprünglich vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln, Deutschland) und wurde aus eigener Nachzucht verwendet. Das entsprechende Saatgut von *N. tabacum* Xanthi nc wurde aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Conrath erhalten.

Die Samen wurden jeweils zur Anzucht auf mit VM Erde (Balster Einheitserdewerk GmbH) gefüllte Plastiktöpfe (7x7x8 cm) ausgestreut und Töpfe in Tablettts unter Plastikhauben gehalten.

Keimlinge wurden nach ca. 10 Tagen pikiert. Insgesamt 5 Wochen nach der Aussaat konnten vollständig entwickelte Blätter der Pflanzen infiltrierte werden. Die Kultivierung erfolgte jeweils im Thermokonstantraum bei 24 °C und einem 16 Stunden Licht-/8 Stunden Dunkel-Rhythmus.

2.3.2.4 Reis (*Oryza sativa*)

Für die makroskopischen Untersuchungen der Infektionsphänotypen von MoNUDIX-Mutanten wurde die Reissorte *Oryza sativa* ssp japonica cv. Nipponbare verwendet.

Zur Anzucht wurden jeweils 8-12 Reiskörner auf mit P-Erde (Balster Einheitserdewerk GmbH) gefüllte Plastiktöpfe (7x7x8,5 cm) gestreut und mit P-Erde bedeckt. Die Töpfe wurden in mit Wasser gefüllte Tablett gestell, welche mit einer Plastikhaube abgedeckt wurden. Die Pflanzen wurden anschließend in einer Phytokammer mit einem 15 Stunden Licht-/ 9 Stunden Dunkel-Rhythmus bei 24 °C bzw. 23 °C und 80 % relativer Luftfeuchte gehalten. Ca. 5 Tage nach der Aussaat wurden die Pflanzen mit Eisendünger (3,75 g/L Fe-EDTA) gegossen und nach 10-14 Tagen vor Ausbildung des vierten Blattes inokuliert.

2.4 Inokulation und makroskopische Analyse

Zur Inokulation wurden 14 Tage alte Kulturen (s. 2.3.1.1) mit vollentsalztem Wasser aus der Hausanlage (VE-Aq.) aufgeschwemmt und mit einem Spatel abgeschabt. Das so gewonnene pilzliche Material wurde anschließend zur Trennung von Mycel und Sporen über drei Lagen Verbandsmull filtriert und ausgedrückt. Die Sporenkonzentration wurde mit Hilfe einer Thomakammer bestimmt und durch Verdünnen angepasst. Für eine gleichmäßige Benetzung der Pflanzenoberfläche, wurde die Lösung mit Gelatine-Tween-Lösung 1:1 verdünnt und somit die Endkonzentration erreicht (750.000 mL⁻¹ für Transkriptionsanalysen und 150.000 mL⁻¹ für makroskopische und mikroskopische Analysen). Tween20, ein nichtionisches Tensid, verringert die Oberflächenspannung der Lösung und Gelatine verbessert die Haftung der Sporen auf der Blattoberfläche.

Das gebrauchsfertige Inokulum konnte mit Hilfe einer Druckluft betriebenen Spühpistole gleichmäßig auf die Pflanzen aufgebracht werden. Um optimale Infektionsbedingungen für den Pilz zu schaffen, wurden die Pflanzen 24 Stunden im Dunkeln bei ca. 26 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen in der Phytokammer (16 Stunden Licht-/ 8 Stunden Dunkel-Rhythmus bei 18 °C und 65 % relativer Luftfeuchte) unter einem Zelt aus

durchsichtiger Plastikfolie bis zur Ernte von Proben inkubiert. So konnte eine für die Infektion günstige hohe Luftfeuchtigkeit erhalten werden.

Für die makroskopische Analyse wurden Primärblätter bis zur Entwicklung von Blastsymptomen inkubiert (ca. 4-7 Tage) und diese fotografisch dokumentiert.

Gelatine-Tween-Lösung

Gelatine	2	g L ⁻¹
TWEEN20	1	ml L ⁻¹

2.5 *In vitro* Keimung von Konidiosporen

Für die Keimung von Konidiosporen *in vitro* wurden Sporen wie für die Inokulation von ein oder zwei Agarplatten geerntet (s.o.), wobei das gebrauchsfertige Inokulum anschließend mit kleinen Sprühfläschchen aus Glas (50 mL) auf Glasplatten aufgesprüht wurde. Die so beimpften Glasplatten wurden schließlich in einer großen Plastikbox mit Deckel, die mit feuchtem Küchenkrepp ausgekleidet war, bei konstanter Temperatur (23 °C) inkubiert. Nach ca. 4-6 Stunden wurde die Keimung der Konidiosporen mikroskopisch kontrolliert. Hatten Konidiosporen bereits Keimschläuche ausgebildet, wurden die gesamten pilzlichen Strukturen von den Glasplatten mit einer Rasierklinge abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.6 Mikroskopische Analysen

Mikroskopische Analysen wurden mit Mikroskopen der Firma Leica (DMR, DMRBE, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Für die mikroskopische Analyse wurden Primärblätter von Gerstenpflanzen nach der Ernte in Entfärbelösung gegeben, welche nach 1-2 Tagen ausgetauscht wurde. Nach dem vollständigen Entfärben der Blätter wurden diese in 20 % Glycerin oder Reinstwasser (Aq_{reinst}) überführt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Zur Auswertung wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen zwischen Pathogen und Pflanzenzelle kategorisiert. Pilzliche Strukturen konnten vor der Mikroskopischen Auswertung durch das Eintauchen in Tinte-Essigsäure (10 % Tinte in Essigsäure [25 %]) leichter sichtbar gemacht werden.

Entfärbelösung

Ethanol	86 %	[v/v]
Essigsäure	14 %	[v/v]

2.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Durch die Akkumulation phenolischer Substanzen im Bereich der Zellwände, können bestimmte Abwehrreaktionen gegen pilzliche Pathogene in Gerstenzellen unter Auflichtfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Diese phenolischen Komponenten geben durch Anregung im Bereich zwischen 450 und 490 nm grünliche Fluoreszenz ab, welche mit spezifischen Filtern detektiert werden kann. Für eine phänotypische Analyse der *Magnaporthe* Mutanten während der Interaktion mit Gerste wurden inokulierte Gerstenprimärblätter wie oben beschrieben zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, präpariert und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Exzitationsfilter BP 450 - 490 nm, dichromatischer Spiegel 510 nm, Sperrfilter LP 515 nm). Dabei wurden pro Primärblatt mindestens 100 Interaktionsstellen in verschiedene Interaktionstypen kategorisiert (Abbildung 9, Abbildung 12 und Abbildung 32). Es wurden pro Interaktion und Zeitpunkt die Interaktionstypen dreier Primärblätter prozentual ausgewertet.

2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten aus den mikroskopischen Analysen wurde das Programm SigmaStat® (Version 3.5) verwendet. Es wurden jeweils die prozentualen Werte dreier Primärblätter aus drei unabhängigen Versuchen (insgesamt neun Blätter) gemittelt und die Standardabweichung sowie der Standardfehler bestimmt. Die erhaltenen Werte der Wildtypkontrolle wurden mit Hilfe eines paarweisen t-Tests mit den Daten der pilzlichen Transformanten verglichen. War ein t-Test auf Grund der Normalverteilung nicht möglich wurde ein Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt. Jeder Interaktionstyp wurde dabei getrennt ausgewertet. Statistisch signifikante Unterschiede sind in der vorliegenden Arbeit mit einem Sternchen (t-Test) oder einer Raute (Mann-Whitney-Rangsummentest) gekennzeichnet.

2.8 Präparation von RNA

2.8.1 Hot Phenol-Methode

Zur Analyse des Transkriptoms von *M. oryzae* während der Interaktion mit Gerste wurde eine RNA-Isolationsmethode mit heißem Phenol (engl. Hot Phenol) gewählt (Dudler and Hertig, 1992), wobei in TE-Puffer äquilibriertes Roti-Phenol (Carl Roth / 0038.2) pH 7,5-8,0 verwendet wurde. Von inokulierten Pflanzenproben wurde zunächst die Epidermis abgezogen. Diese Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und aus dem Pulver durch Zugabe von 1000 µL eines 85 °C heißen Phenol:NETS-Gemisches (1:1) und intensivem Mischen die RNA extrahiert.

Nach 10' Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben 5' bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf) um phenolische und wässrige Phase zu trennen. Anschließend wurde der wässrige Überstand einem erneuten Extraktionsschritt mit einem Volumen Phenol ohne NETS unterzogen und nach erneutem Mischen auf dem Vortex 10' auf Eis inkubiert. Durch erneute 5' Zentrifugation bei 4 °C und 14.000 rpm wurden phenolische und wässrige Phase wiederum voneinander getrennt. Die RNA wurde anschließend aus dem wässrigen Überstand mit zwei Volumen Ethanol (100 %) und einem Zehntel Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) über Nacht gefällt. Die RNA wurde daraufhin 30' bei 4 °C und 14.000 rpm pelletiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Danach konnte das RNA-Pellet in mit DEPC behandeltem Reinstwasser ($Aq_{\text{reinstDEPC}}$) aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt werden.

2 x NETS

NaCl	0,2	M
EDTA	2	mM
TrisCl (pH 7,5)	0,02	mM
SDS	1	% (w/v)

Autoklavieren

2.8.2 Zitronensäuremethode

Sollte RNA aus frischen *in vitro* gekeimten Konidiosporen extrahiert werden, wurde eine Isolationsmethode mit Zitronensäure angewendet. Dazu wurde das gesamte von Glasplatten geerntete Konidienmaterial (s. 2.5) mit jeweils 5 Glaskügelchen (Durchmesser ca. 1mm) und 300 µL Zellysepuffer zu dem von einer Glasplatte (ca. 10 x 20 cm) geernteten pilzlichen Material gegeben. Anschließend wurde die Zellen in der Kugelmühle (Precellys24 lysis & homogenization, Peqlab Biotechnologie GmbH) mechanisch aufgeschlossen, wobei 3x 15" bei 5500 rpm geschüttelt wurde. Nach Zugabe von 100 µL Proteinpräzipitationspuffer, wurde die Probe 5' auf Eis inkubiert und schließlich bei 4 °C und 14.000 rpm 10' extrahiert. Der wässrige Überstand wurde nochmals zentrifugiert, der Überstand erneut abgenommen und die RNA schließlich durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol innerhalb von 20' gefällt. Die RNA wurde bei 4 °C und 14.000 rpm 20' pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes mit Ethanol (70 % in Aq_{reinst}) gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 10-20 µl Aq_{reinst} aufgenommen.

Zellysepuffer

SDS	2	%
(<i>tri</i>)-Na-Citrat	68	mM
Zitronensäure	132	mM
EDTA	10	mM

autoklavieren

Proteinpräzipitationspuffer

NaCl	4	M
(<i>tri</i>)-Na-Citrat	17	mM
Zitronensäure	33	mM

2.9 cDNA Synthese

Um RNA in DNA (cDNA, engl. complementary DNA) umzuschreiben, verwendet man i.d.R. das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses Enzym besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität und stammt ursprünglich aus Viren. In dieser Arbeit wurde die *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) Reverse Transkriptase verwendet, die zusätzlich RNase H-Funktion besitzt, durch die der RNA-Matrizenstrang abgebaut wird.

Für die Reverse Transkription musste zunächst evtl. vorhandene DNA aus den Proben entfernt werden. Dazu wurde jede Probe einem DNase I-Verdau unterzogen:

RNA	2-4	µg
DNase Puffer mit MgCl ₂ (Thermo Fisher Scientific)	1	µL
DNase I (Thermo Fisher Scientific)	1	µL
Aq _{reinst} DEPC	ad 10	µL

Die Ansätze wurden durch Klopfen gemischt und kurz abzentrifugiert. Der DNase I-Verdau erfolgte bei 37 °C innerhalb von 30'. Anschließend wurde das Enzym bei 70 °C 15' inaktiviert und die Ansätze auf Eis abgekühlt.

Zur anschließenden Reversen Transkription wurden zunächst 2 µL Primer HindANCHOR-T [10 pmol · µL⁻¹] als Startpunkt für die Reverse Transkriptase zu jeder Probe gegeben. Die Sequenz dieses Primers (AAGCTTTTTTTTTTTTTTTT(AGC)) ist komplementär zum Poly A-Schwanz von mRNA. Nach der Zugabe des Primers wurden die Proben zur Denaturierung bei 70 °C inku-

biert. Für die eigentliche Reverse Transkription wurden die Ansätze um folgende Komponenten ergänzt:

RT-Puffer (Thermo Fisher Scientific)	4 μL
RevertAid™ M-MuLV-RT (Thermo Fisher Scientific)	1 μL
dNTPs [10mM]	2 μL
AQ _{reinst} DEPC	1 μL

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C innerhalb von 60'. Anschließend wurde das Enzym innerhalb von 10' durch Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Die cDNA-Proben wurden bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) ist ein Verfahren mit dem spezifische Genabschnitte vervielfältigt werden können. Diese Amplifikation wird i.d.R. von einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (*Taq*) vermittelt. Als Synthesestartpunkt für das Enzym dienen zwei kurze Oligonukleotide von ca. 20 Basenpaaren Länge (Primer, s. 2.1), die den zu vermehrenden DNA-Abschnitt begrenzen. Da die *Taq*-Polymerase DNA in 5'→3'-Richtung synthetisiert, hybridisiert jeder Primer an einem der beiden Doppelstränge. Die Reaktion selbst wird in drei Teilschritte gegliedert. Im ersten Teilschritt wird der Doppelstrang bei 90 °C denaturiert, um den zu synthetisierenden Abschnitt (engl. Template) zugänglich zu machen (Denaturierung). Im nächsten Teilschritt hybridisieren die Primer mit dem Template (engl. Annealing), wobei jeder Primer eine optimale Annealingtemperatur besitzt, die von dessen Sequenz abhängig ist. Schließlich wird im letzten Teilschritt das gewünschte Genprodukt synthetisiert (engl. Elongation). Hierzu wählt man die optimale Reaktionstemperatur für die *Taq*-Polymerase (i.d.R. 72 °C). Nach Abschluss des dritten Teilschritts, beginnt die Reaktion von vorne, wobei nun auch die im ersten Zyklus synthetisierten Abschnitte als Template dienen können. Die Anzahl an synthetisiertem Template steigt entsprechend mit jedem Reaktionszyklus exponentiell an.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Taq*-Polymerasen waren die SilverStar *Taq*-Polymerase (EuroGenTec) für das Screening putativer Transformanden (s. 2.14 und 2.15.1) und die Phusion® Polymerase (Thermo Fisher Scientific) mit proof-reading Aktivität für alle PCRs zur Generierung der KO-Konstrukte (s. 2.13.1). Alle PCRs wurden entsprechend den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers durchgeführt.

2.10.1 RT-qPCR

Bei einer PCR nimmt die Produktmenge während optimaler Reaktionsbedingungen exponentiell zu, dieser Tatsache bedient sich die quantitative Real Time PCR (RT-qPCR), da bei Einsatz interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszenz und Produktmenge korrelieren. Die Phase, in der die Bedingungen optimal ablaufen, die exponentielle Phase, wird mit dem so genannten C_T -Wert (engl. cycle threshold) eingeläutet, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Bei GenTranskriptabundanzanalysen wird cDNA als Template in die RT-qPCR eingesetzt, wodurch das gesamte Transkriptom zu einem bestimmten Zeitpunkt repräsentiert ist. Um zu analysieren, ob ein Gen stark, nur gering oder gar nicht transkribiert wird, kann der C_T -Wert des zu untersuchenden Gens mit dem eines konstitutiv exprimierten Gens verglichen werden dessen Expression unter gegebenen Versuchsbedingungen konstant bleibt. So wird die relative Transkriptakkumulation in Relation zum konstitutiven Gen erhalten. Als Farbstoff kann zum Beispiel, wie im Rahmen dieser Arbeit, der Cyanin Farbstoff SYBR Green I verwendet werden, der in Verbindung mit doppelsträngiger DNA grün fluoresziert. Als Kontrolle wurden, den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-qPCRs, eine Schmelzpunktanalyse angeschlossen. Hierbei wird der spezifische, sequenzabhängige Schmelzpunkt des entstehenden Produktes bestimmt. Die Spezifität des Produkts kann anschließend, wie in der vorliegenden Arbeit, mit einer Sequenzierung des entstandenen Produktes überprüft werden.

Von cDNA-Proben, in denen die Expression eines bestimmten Gens nachgewiesen werden sollte, wurden 1:20-Verdünnungen als Template verwendet. Generell wurden jeweils drei technische Replikate jedes Ansatzes eingesetzt. Die Proben wurden in MicroAMP™ Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems®) pipettiert, die mit MicroAMP™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®) verschlossen wurden. Jeder Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

5 μ L (Invitrogen)	Platinum® SYBR® Green RT-qPCR SuperMix-UDG with Rox
0,5 μ L	Primer forward [10pmol/ μ L]
0,5 μ L	Primer reverse [10pmol/ μ L]
2 μ L	Aq _{reinst}
2 μ L	cDNA

Der Platinum® SYBR® Green RT-qPCR SuperMix-UDG with Rox enthielt die Platinum® Taq-Polymerase, MgCl₂, Puffer, Stabilisatoren und Desoxy-Nukleotide, darüber hinaus waren eine hitzelabile Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) zum Abbau von dUTP-haltigen Verunreinigungen der

cDNA und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I enthalten. Als Referenzfarbstoff enthielt der Mix Rox, um das Fluoreszenzsignal zu normalisieren.

Es wurde folgendes Programm im ABI Prism® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchlaufen:

50 °C	2 min		} 40x
95 °C	10 min		
95 °C	15 s	(Denaturierung)	
60 °C	1 min	(Annealing, Elongation)	

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die ABI Prism 7300 SDS Software Version 1.4 von Applied Biosystems genutzt. Die Auswertung der relativen Transkriptakkumulation erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Als konstitutives Referenzgen wurde *M.o.- α -Tubulin* oder *Elongationsfaktor1* verwendet.

2.11 Gelelektrophorese

Durch Nukleinsäure-Gelelektrophorese können Gemische von Nukleinsäurefragmenten unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. Das Verfahren beruht darauf, dass Nukleinsäuren durch die enthaltenen Phosphatgruppen negativ geladen sind und deswegen in einem elektrischen Feld zur positiven Anode wandern. Die Geschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Größe des Nukleinsäurefragments. Als Matrix dient, wie in dieser Arbeit, i.d.R. Agarose.

2.11.1 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1 % Agarosegele (w/v) mit 1x TBE Puffer hergestellt. Die Gele wurden dabei mit 1 μ L Ethidiumbromid (10 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹) pro 10 mL 1x TBE versetzt. DNA-Proben wurden mit 5x Ladepuffer versetzt und als Laufpuffer wurde entsprechend 1x TBE verwendet. Da Ethidiumbromid in Nukleinsäuren interkaliert und durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert, konnten DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse wurden mit dem Geldokumentations-System UV Transilluminator (WealTec) dokumentiert. Zum Größen- und Konzentrationsabgleich der Proben wurden jeweils 6 μ L GeneRuler™ DNA Ladder Mix oder GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) auf jedes Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei ca. 90 V durchgeführt.

10 x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)

Tris	0,9	M
Borsäure	0,9	M
EDTA (Na-Salz)	25	mM
pH-Wert 8,3, autoklavieren		

5 x DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	2,5	g L ⁻¹
Saccharose	200	g L ⁻¹
das Gemisch in 5x TBE lösen		

2.11.2 Denaturierende Gelelektrophorese

RNA-Proben konnten nach der RNA-Extraktion elektrophoretisch aufgetrennt werden, um deren Qualität zu überprüfen. Da RNA einzelsträngig ist und komplementäre Sequenzabschnitte miteinander hybridisieren können, wurden RNA-Proben in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden in 1x MOPS hergestellte 1,5 % Agarosegele (w/v) verwendet. Dem noch flüssigen Gel wurden 5 % Formaldehyd zugegeben, das für die Denaturierung der RNA sorgte. Zusätzlich wurden die, auf 10 µL mit Probenpuffer aufgefüllten und 1 µg der zu analysierenden RNA enthaltenden, Proben für 5' bei 98 °C im Heizblock denaturiert. Die Elektrophorese wurde anschließend bei 80 V durchgeführt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese wurden mit dem Geldokumentations-System UV Transilluminator (WealTec) dokumentiert.

RNA-Probenpuffer

Für 1,5ml:

Formamid	720	µL
Ethidiumbromid [10 µg·µl ⁻¹]	100	µL
Formaldehyd (37%)	260	µL
10x MOPS	160	µL
Bromphenolblau (gesättigt)	80	µL
Glycerin (steril)	80	µL
Aq _{reinst}	100	µL

Lagerung bei -20 °C

10x MOPS (3-(N-Morpholino)propane sulfonic acid)

MOPS	200	mM
Natriumacetat	50	mM
EDTA (Na-Salz)	10	mM

pH-Wert 7,0, autoklavieren

2.12 Klonierungsarbeiten mit *E. coli***2.12.1 Kultivierung und Transformation**

Übernachtskulturen von *E. coli* wurden in Kulturröhrchen aus Glas in 4 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika über Nacht im 37 °C-Schüttler (Gallenkamp) bei 210 rpm angezogen. Zur längerfristigen Lagerung von *E. coli* wurden Glycerolstocks angelegt. Hierzu wurden 750 mL Übernachtskultur und 150 µL steriles Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren, Glycerolstocks wurden bei -80 °C gelagert.

Für alle Klonierungsarbeiten wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* des Stammes DH5α verwendet. Zur Transformation wurden die in Aliquots von 50 µL bei -80 °C gelagerten Zellen mit 1-2 µL Plasmidlösung (s. 2.12.2) oder 5-10 µL Ligationsansatz (s. 2.12.5) 30' auf Eis inkubiert. Dadurch sollte sich die DNA an die Zelloberfläche anlagern. Schließlich wurden die Zellen für exakt 30" bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, wodurch die DNA aufgenommen wurde. Zur Regeneration der Zellen wurde 500 µL LB-Medium hinzugefügt und bei 37 °C mind. eine Stunde geschüttelt. Die regenerierten Zellen wurden je nach Resistenzgen auf entsprechende Antibiotika enthaltende LB-Platten ausplattiert. Von Kolonien wurde eine Übernachtskultur angelegt und Plasmid-DNA isoliert.

LB-Medium

Trypton	1,0	% (w/v)
Hefe-Extrakt	0,5	% (w/v)
NaCl	1,0	% (w/v)

Für die Herstellung von LB-Agar hinzufügen:

Agar-Agar	15	g L ⁻¹
-----------	----	-------------------

Autoklavieren

2.12.2 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab (Minipräparation) wurde ein Verfahren angewendet, bei dem bakterielle Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen werden. Es wurden zunächst 2 mL einer Übernachtskultur bei Raumtemperatur und 10.000 rpm 5' zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf) um Zellen von Medium zu trennen. Das Pellet wurde schließlich durch Vortexen vollständig in 200 µL Solution I resuspendiert, wobei das enthaltene EDTA den Zellwänden Kationen entzog und sie so für alle weiteren Behandlungen zugänglich machte. Nach Zugabe von 400 µL Solution II wurden die Proben vorsichtig geschwenkt, so dass die gesamte Gefäßwand benetzt war. Solution II enthielt SDS (Natriumdodecylsulfat), das Proteine denaturiert. Zusätzlich war NaOH enthalten, das doppelsträngige DNA denaturiert. Nach der Zugabe von 300 µL Solution III renaturierte die Plasmid-DNA wieder, da der pH-Wert wieder abgesenkt wurde. Lineare DNA und Proteine fielen nun als weißer Feststoff aus, der durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert wurde. Die Plasmid-DNA wurde schließlich aus dem Überstand durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt. Die anschließend pelletierte Plasmid-DNA wurde mit eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen und das Pellet in 50 µL TE-Puffer oder Aq_{reinst} aufgenommen. Schließlich wurde ein RNase Verdau durchgeführt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei 4 °C oder -20 °C.

Solution I

Glucose	50	mM
TrisCl (pH 8,0)	25	mM
EDTA (pH 8,0)	10	mM

Solution II

Natriumhydroxid (NaOH)	0,2	M
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10	g L ⁻¹
Lagerung bei Raumtemperatur		

Solution III

5 M Kalium-Acetatlösung	60	mL
Eisessig	11,5	mL
Aq _{reinst}	28,5	mL

TE-Puffer

TrisCl (pH 8,0)	10	mM
EDTA (pH 8,0)	1	mM

2.12.3 Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Sequenzabschnitte doppelsträngiger DNA und schneiden diese an definierter Position. Dabei entsteht ein individuelles Schnittmuster. DNA-Fragmente, die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, haben an der Schnittstelle das gleiche Schnittmuster und können so neu angeordnet und zusammengefügt (Ligation) werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Überexpressions- und Silencingkonstrukt von *MoNUDIX* auf diese Art und Weise in die Plasmide pTK144 bzw. pSILENTDual (s. 2.2.1 bzw. 2.2.2) kloniert. Mittels elektrophoretischer Auftrennung (s. 2.11.1) des Restriktionsansatzes konnten die Größen der entstandenen DNA-Fragmente überprüft werden, was als Kontrolle der Klonierung diente. Für die Restriktionsanalysen in der vorliegenden Arbeit wurden Fast Digest® Restriktionsenzyme der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet.

2.12.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollten nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau entstandene einzelne DNA-Fragmente für eine Klonierung weiterverwendet werden, wurden Banden entsprechend der Größe des Zielfragments mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen wurden die Fragmente nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert und in 35-50 µL Aq_{reinst} aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Fragmente im erhaltenen Eluat bestimmt. Dazu wurde 1 µL des Eluats auf ein weiteres Gel aufgetragen und mit den Banden des Größenmarkers GeneRuler™ DNA Ladder Mix von Thermo Fisher Scientific verglichen, welcher DNA-Fragmente definierter Größe und Konzentration enthält.

2.12.5 Ligation

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten werden kompatible Enden miteinander verknüpft. Solche kompatiblen Enden entstehen durch Restriktionsenzyme oder definierte Überhänge an PCR-Primern. Die Ligation wird durch das Enzym Ligase vermittelt, das die Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Phosphatrest und 3'-Hydroxygruppe katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ligation in der Regel in einem 10 µL-Ansatz angesetzt, wobei 1 µL Ligase (T4 DNA Ligase der Firma Thermo Fisher Scientific) eingesetzt wurde. Die Mengen des DNA-Fragments und des Vektors wurden nach folgender Formel (Mülhardt, 2009) bestimmt:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

2.12.6 Gateway® Klonierung

Neben den bisher beschriebenen klassischen Klonierungstechniken sind andere kommerzielle Klonierungssysteme erhältlich, die eine höhere Klonierungseffizienz versprechen. Eine dieser Klonierungstechniken ist die Gateway®-Klonierung (Invitrogen). Sie beruht auf dem sequenz-spezifischen Rekombinationssystem des Phagen λ , wobei die spezifischen Sequenzen einerseits in den Gateway kompatiblen Plasmiden vorhanden sind, andererseits an die zu integrierenden DNA-Fragmente durch Primerüberhänge (engl. att-sites) anhängt werden müssen. Der Integrationsschritt des Fragments in diesen Vektor wird BP-Reaktion genannt, nach der sich das zu klonierende Fragment in einem Zwischenvektor befindet (in dieser Arbeit pDONR207, Entry-Clone, von Invitrogen). Von diesem Vektor ausgehend kann das DNA-Fragment schließlich in jede Art von Endvektor durch die so genannte LR-Reaktion transferiert werden (Destination-Clone). Beide Reaktionen (BP und LR) werden durch spezifische Enzymmische katalysiert, die von der Firma Invitrogen bezogen werden müssen. Die Gateway®-Klonierung wurde nach Herstellerangaben, jedoch in einem halben Ansatz von 10 μ L, durchgeführt und für alle Klonierungsschritte, die die transiente Expression in Tabak betreffen, angewendet. Hierfür wurde der Gateway® kompatible Vektor pB7WG2 (s.2.2.3) verwendet.

2.12.6.1 Generierung von Konstrukten für die Gateway® Klonierung

Zur Generierung zu klonierender spezifischer Genfragmente mit Gateway®-kompatiblen Überhängen, wurden spezifische Primer designt (attB-Primer). Diese Primer enthielten neben der genspezifischen Basensequenz (17-24 bp) entweder eine verkürzte Version der gesamten „attB-site“ (<http://www.med.upenn.edu/lamitalab/documents/Gatewaycloneprimerdesign.pdf>) oder nur einen ersten Teil der kompletten „attB-site“. Im letzteren Fall wurde nach dem Protokoll „Primer Design for GATEWAY attB primers“ von Won Do Heo vorgegangen (<http://web.stanford.edu/~teruel1/Protocols/pdf/Primer%20design%20for%20the%20gateway%20system.pdf>). Hierbei folgt nach einer ersten PCR, in der das zu klonierende Fragment mit genspezifischen Primern und einem Teil der benötigten „attB-site“ amplifiziert wird, eine zweite PCR, die die „attB-site“ durch Verwendung so genannter Adapterprimer vervollständigt. Diese Adapterprimer enthielten entsprechend den zweiten Teil der kompletten attB-site und konnten entsprechend für jedes Konstrukt verwendet werden. Auf diese Art konnten kürzere, genspezifische Primer in die erste Synthese-PCR eingesetzt werden, die kostengünstiger in der Synthese waren und die PCR vereinfachten. Für alle attB-PCRs wurde eine Polymerase mit „proof-reading“ Aktivität (Phusion®, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerempfehlungen eingesetzt.

2.13 Transformation von *M. oryzae*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokolle für die Protoplastierung und die Transformationsreaktion zur Generierung von Deletions- oder Überexpressionstransformanten von *M. oryzae* wurde aus dem Labor von Nicholas Talbot (Exeter University, UK) erhalten und während eines dreitägigen Aufenthaltes dort mit freundlicher Unterstützung von Dr. Lauren Ryder erlernt.

2.13.1 DJ-PCR und geteilte Resistenzmarkierung zur Generierung von KO-Konstrukten

Zur Generierung der zur Transformation verwendeten Deletions- oder Knock-out (KO)-Konstrukte wurde die so genannte Double Joint (DJ)-PCR (Yu et al., 2004) angewendet. Ein ausführliches und optimiertes Protokoll wurde dabei freundlicherweise von Ralf Horbach (Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt. Dabei wurden die zuvor separat amplifizierte 5' bzw. 3' untranslatierten Regionen (UTRs) des Zielgens mit einer Hygromycin-resistenz vermittelnden Expressionskassette (Hyg^R) fusioniert. Dies wurde durch komplementäre Überhänge gewährleistet, die durch die verwendeten Primer vermittelt wurden. Das so generierte aus 5'UTR, Hyg^R und 3'UTR bestehende KO-Konstrukt wurde allerdings nicht vollständig in die Transformationsreaktion eingesetzt. Bei dieser geteilten Resistenzmarkierung wurde die Anzahl von falsch-positiven Transformanten reduziert (Catlett et al., 2003), da eine vollständige Deletion des Gens nur dann gewährleistet werden konnte, wenn beide Teile des KO-Konstruktes am Zielort integrierten. Es wurden entsprechend zwei zusätzliche PCRs durchgeführt, bei denen zwei in der Mitte überlappende „Hälften“ des Konstrukts erhalten wurden. Dabei wurde jeweils die Primerkombinationen „5'-Flanke_F und YG“ bzw. „3'-Flanke_R und HY“ verwendet (s. Tabelle 2). Da HY und YG jeweils innerhalb von Hyg^R hybridisierten, konnten sie entsprechend für die Generierung jedes Konstrukts verwendet werden. Beide „Hälften“ des zu transformierenden Konstrukts wurden anschließend in die Transformationsreaktion eingesetzt. Alle durchgeführten PCRs wurden mit einer proof-reading Polymerase (Phusion®, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für eine ausführliche grafische Darstellung der Vorgehensweise s. Abbildung 7 und die Erläuterungen im Text (3.2.1).

2.13.2 Protoplastierung

Vor der Transformation musste zunächst Mycel von *M. oryzae* protoplastiert werden. Dazu wurde eine Flüssigkultur von *M. oryzae* (s. 2.3.1.2) durch drei Lagen sterilen Mull vom Medium ge-

trennt, mit 200 mL autoklaviertem Aq_{dest} gewaschen und in 40 mL OM/Glucanex aufgenommen. Bei Glucanex handelt es sich um ein Chitinasen und Zellulasen enthaltendes Pulver, dass bei industrieller Fermentation als Nebenprodukt gewonnen werden kann. Bei dem anschließenden dreistündigen Verdau des Mycels bei 30 °C und 75 rpm wurden pilzliche Zellwände verdaut, so dass ausschließlich der Protoplast erhalten blieb. Die entstandenen Protoplasten wurden nach Überschichten des Ansatzes mit ST-Puffer und anschließende Dichtegradientenzentrifugation in einem Spin-out Rotor (Sorvall HB6, 3920 g, 15', 4 °C) aus der Interphase gewonnen. Anschließend wurden die Protoplasten zweimal durch Pelletieren (1410 g, 10', 4 °C) und Resuspendieren in STC-Puffer gewaschen. Das nach dem zweiten Waschschrift erhaltene Pellet wurde in dem je nach Anzahl der Transformationsansätze benötigten Volumen STC resuspendiert und die Protoplasten frisch verwendet.

OM/Glucanex

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2	M
NaPO ₄ buffer (pH 5,8)	10	mM
Glucanex	1,8	g
pH 5,6 (mit 1 M Na ₂ HPO ₄ einstellen), filtersterilisieren		

ST Puffer

Sorbitol	0,6	M
Tris-HCl pH 7,0	0,1	M
Autoklavieren		

STC Puffer

Sorbitol	1,2	M
Tris-HCl pH 7,5	10	mM
CaCl ₂	10	mM
Autoklavieren		

2.13.3 Transformationsreaktion

In die Transformationsreaktion wurden jeweils 150 µL frische Protoplastenlösung eingesetzt. Sie wurden mit 5 µg KO-Konstrukt kombiniert und bei Raumtemperatur für 30' inkubiert. Bei diesem Schritt sollte sich die DNA an die Membran der Protoplasten anlagern. Schließlich wurden vorsichtig 5 x 200 µL des PEG enthaltenden PTC Puffer hinzugefügt, wobei das Reaktionsgefäß leicht gedreht wurde. Exakt 15' nach Zugabe der ersten 200 µL PTC wurden 3 mL TB3 Medi-

um zugegeben und die Protoplasten über Nacht bei 25 °C und 125 rpm regeneriert. Am nächsten Tag wurde jeder Ansatz Protoplasten in 150 mL handwarmen OCM Agar (CM Agar mit 273,84 g/L Sucrose, pH 6,5, s. 2.3.1.1) gegossen und die Mischung in sechs Petrischalen verteilt. Nach Erhärten des Agars wurde eine dünne Schicht Hygromycin enthaltener CM Agar (600 µg/mL) darüber gegossen (10-15 mL). Als Kontrolle wurde immer auch ein Ansatz mitgeführt, der ohne DNA, aber mit einem entsprechenden Volumen $A_{q_{reinst}}$ inkubiert wurde. Von diesem Ansatz wurden jeweils drei Platten mit CM Agar ohne Hygromycin und jeweils drei Platten mit CM Agar mit Hygromycin überschichtet. So wurde einerseits kontrolliert, dass die Protoplasten lebensfähig waren und andererseits, dass die Selektionsschicht funktionstüchtig war. Alle Platten wurden anschließend bis zum Auswachsen putativer Hygromycin resistenter Transformanden inkubiert (7-14 Tage). Auswachsende Kolonien wurden schließlich mit dem Skalpell ausgestochen und auf neue CM Platten mit Hygromycin (200 µg/mL) überimpft. Zeigten sie weiterhin Wachstum, wurden sie auf CM Platten mit Cellophan überimpft, um genomische DNA (gDNA) zu isolieren (s. 2.14.1).

PTC Puffer

PEG ₄₀₀₀	60	%
Tris-HCl pH 7,5	10	mM
CaCl ₂	10	mM

Unter Rühren und leichtem Erwärmen lösen, autoklavieren

TB3

Sukrose	20	% [w/v]
Hefeextrakt	0,3	% [w/v]

Autoklavieren

2.14 Screening der *M. oryzae* Transformanden

Um nach einer Transformation den Genotyp putativer *M. oryzae* Transformanden zu überprüfen, musste zunächst die genomische DNA (gDNA) isoliert werden. Anschließend wurde die erhaltene gDNA in eine PCR eingesetzt, um bei Deletionsmutanten, die Abwesenheit des spezifischen ORFs (engl. Open Reading Frame) direkt am Wildtyplokus zu überprüfen. Bei Überexpressions- oder Silencingmutanten wurde ebenfalls zunächst eine PCR durchgeführt um die Anwesenheit des Überexpressionskonstrukts nachzuweisen. Allerdings war in diesen Fällen der Integrationsort des transformierten Konstrukts nicht gerichtet. Die gDNA der erhaltenen Transformanden

wurden aus diesem Grund zusätzlich auf eine Nylonmembran geblottet (Southern Blot) und anschließend durch Immunodetektion die Anzahl der Insertionen und die Unabhängigkeit verschiedener Klone ermittelt.

2.14.1 Präparation von gDNA

Zur gDNA-Isolation wurde ein Protokoll aus der Arbeitsgruppe von Alexandra Worden (MBARI, CA, USA) auf der Basis von CTAB (Hexa-decyl-tri-methyl-Ammoniumbromid) verwendet, welches eine sehr saubere gDNA ohne den Einsatz von Phenol liefert. Das pilzliche Mycel wurde von CM-Platten gewonnen, das auf dort ausgelegtem Cellulosehydrat (Zellglas) gewachsen war. Das Zellglas konnte einfach abgezogen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend zusammen mit dem Mycel zu feinem Pulver gemörsert werden. Für die gDNA Extraktion wurde ungefähr eine Spatelspitze des Pulvers in 800 μ L und 60 °C warmem CTAB Puffer bei 60 °C für 1 Stunde inkubiert. So wurden die Zellen aufgeschlossen. Das enthaltene β -Mercaptoethanol und Proteinase K denaturierten dabei vorhandene Proteine. Die anschließende Extraktion der DNA wurde mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und die darauf folgende Zentrifugation bei 4 °C (10') durchgeführt. Zur wässrigen Phase wurde schließlich 1 μ L RNase A (Thermo Fisher Scientific) zugegeben und ein 30minütiger RNase Verdau bei 37 °C vorgenommen. Schließlich wurde die gDNA mit Hilfe von Isopropanol für 2 Stunden gefällt, wobei zwei Drittel des vorhandenen Volumens verwendet wurden. Die bei 4 °C pelletierte DNA wurde anschließend mit Ethanol (70 %) gewaschen und in Aq_{reinst} aufgenommen.

2.14.2 Southern Blot

Nach der Erzeugung von Überexpressions- und Silencing Mutanten von *MoNUDIX* in *M. oryzae* Isolat 70-15 (s. 3.5.3), mussten putative Transformanden auf die Insertion der entsprechenden Genkonstrukte kontrolliert werden. Da die verwendeten Überexpressions- und Silencing Konstrukte ungerichtet und damit willkürlich im Wildtypgenom integrieren konnten, musste die Geninsertion mit Hilfe eines Southern Blots analysiert werden (Southern, 1975). Zusätzlich konnte durch den Southern Blot gezeigt werden, wie oft das Konstrukt integriert wurde. Bei den verwendeten Konstrukten handelte es sich im Fall der Überexpression um den Vektor pTK144, der den kompletten Leserahmen des *MoNUDIX* Gens unter der Kontrolle des konstitutiven *M. oryzae* Promotors RP27 enthielt. Sollte *MoNUDIX* herunterreguliert werden wurde der Silencingvektor pSILENTDual verwendet.

2.14.2.1 Restriktionsverdau der gDNA

Für den Southern Blot musste nach Transformation und gDNA Extraktion die genomische DNA zunächst verdaut und die Fragmente in einem Gel aufgetrennt werden. Für den Restriktionsverdau wurde jeweils ein Restriktionsenzym ausgewählt, das keine Schnittstelle innerhalb des transformierten Konstrukts besaß. Im Fall der Überexpression handelte es sich dabei um das Restriktionsenzym XhoI und im Fall des Silencings um BglII. Der Restriktionsansatz wurde über Nacht, jedoch weniger als 16 h, angesetzt und setzte sich folgendermaßen zusammen:

Fast Digest® Restriktionsenzym	2	µL
Fast Digest® Green Puffer [10x]	2	µL
gDNA	5	µg
A _Q reinst	ad 20	µL

Vor dem Transfer auf Nylonmembran, wurde die gDNA in einem 0,8 % Agarosegel bei 60 V ca 2 h aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde die gDNA in 250 mM HCl depuriniert, wodurch der pH-Wert im Gel entsprechend abgesenkt wurde. Dies geschah durch 20 minütiges Schwenken in einer Glaspetrischale. Danach wurde die noch doppelsträngige gDNA im Gel 30 Minuten in Denaturierungspuffer denaturiert. Durch die anschließende Inkubation in Neutralisierungspuffer, wurde der pH-Wert im Gel schließlich wieder angehoben, was durch pH-Papier nach 2 x 15' Inkubation kontrolliert wurde. Lag der pH-Wert unter 8,5, musste erneut 15' inkubiert werden. Schließlich konnte die gDNA durch einen aufwärtsgerichteten Kapillartransfer auf eine Nylonmembran geblottet werden.

Denaturierungspuffer

NaCl	1,5	M
NaOH	0,5	M

Depurinierungspuffer

HCl	250	mM
-----	-----	----

Neutralisierungspuffer

Tris-HCl, pH 7,2	0,5	M
NaCl	1,5	M
EDTA	1	mM

2.14.2.2 Aufwärtsgerichteter Kapillartransfer

Der aufwärtsgerichtete Kapillartransfer geschah durch die Rückseite des Gels, weswegen das Gel entsprechend mit der „Bauchseite“ auf einen ca. 30 cm langen, von der Breite an das Gel angepassten Streifen feuchtem Whatman®-Papier (Schleicher und Schuell) gelegt wurde (Docht). Der Whatman®-Papier-Streifen war auf einer Trägerplatte positioniert und tauchte mit beiden langen Seiten in Blotting Puffer (20 x SSC) ein, der in einer Plastikschiene ca. 1,5 cm hoch stand. Ein von der Größe an das Gel angepasstes Stück positiv geladene Roti® Nylon plus Membran (Carl Roth) wurde zunächst kurz in Aq_{reinst} und anschließend 15' in 20 x SSC äquilibriert, bevor es blasenfrei auf der Rückseite des Gels positioniert wurde. Auf die Membran wurden zwei Lagen angefeuchtetes und drei Lagen trockenes Whatman®-Papier gelegt. Abschließend wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel Papierhandtücher auf dem Whatman®-Papier positioniert und das Ganze mit einer Glasplatte und einem Gewicht fixiert. Der Transfer geschah über Nacht. Nach dem Blotting wurde die Membran im Ultraviolet Crosslinker (Amersham Life Sciences) UV-Licht exponiert (1200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) um die gDNA irreversibel auf der Membran zu fixieren. Die Membran konnte anschließend bei Bedarf in handelsüblicher Klarsichtfolie bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Blottingpuffer (20 x SSC)

NaCl	3	M
NaCitrat	0,3	M
pH mit HCl auf 7,0 einstellen		

2.14.2.3 Sondenherstellung

Zum Nachweis des transformierten Konstrukts innerhalb des Transformandengenoms, wurden Sonden verwendet, die jeweils innerhalb der Antibiotikaresistenz vermittelnden Expressionskassette innerhalb des verwendeten Konstruktes hybridisieren konnten. Im Fall der Überexpression, bei welcher der Vektor pTK144 verwendet wurde, handelte es sich dabei um eine Hygromycinresistenz vermittelnde Expressionskassette. Wurde der Silencingvektor pSILENTDual verwendet, war eine Genticinresistenz vermittelnde Expressionskassette nachzuweisen. Die hier verwendeten Sonden wurden durch PCR unter Verwendung eines DIG markierten dNTP-Mixes (10 μM DIG-11-dUTP [Roche], 190 μM dTTP und jeweils 200 μM dATP, dGTP und dCTP [jeweils von Thermo Scientific]) mit Hilfe der SilverStar *Taq*-Polymerase (EuroGenTec) unter den standardmäßig angewendeten PCR-Bedingungen hergestellt (s. 2.10). Es wurden die in Tabelle 4 angegebenen Primer zur Sondenherstellung verwendet. Zur Kontrolle der DIG-Markierung wurde parallel zu der Sonden-PCR eine PCR mit dNTP-Mix ohne DIG-Markierung durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte beider Reaktionen auf einem Agarosegel (s. 2.11.1) vergli-

chen. Das markierte Produkt wies dabei ein durch das DIG verursachtes höheres Molekulargewicht auf, was zu einer etwas kürzeren Laufstrecke des DNA-Fragments im Gel führte. Konnte eine erfolgreiche Markierung festgestellt werden, wurde die PCR mit 100 μL $\text{Aq}_{\text{reinst}}$ verdünnt.

2.14.2.4 Prähybridisierung und Sondenhybridisierung

Die Hybridisierungsreaktion zur Anlagerung der Sonde an die auf der Nylonmembran fixierte gDNA, wurde in einem Hybridisierungssofen bei 65 °C durchgeführt. Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde eine Prähybridisierung zur Absättigung der Membran durchgeführt. Die Prähybridisierung erfolgte in vortemperiertem Hybridisierungspuffer 5 mL DIG Easy Hyb (Roche Diagnostic GmbH) in einer kleinen Hybridisierungsröhre (Schott) für 30'. Anschließend wurde die denaturierte Sonde zugegeben (1 μL pro mL DIG Easy Hyb). Die Denaturierung der Sonde erfolgte in 50 μL DIG Easy Hyb 5' bei 94 °C im Heizblock und anschließender Inkubation auf Eis. Die Hybridisierungsreaktion wurde über Nacht durchgeführt.

2.14.2.5 Immunodetektion

Zur Sichtbarmachung des nun mit der DIG-Sonde hybridisierten, transformierten Konstruktes wurde ein Anti-DIG-Antikörper (Roche Diagnostic GmbH) verwendet. Nach der Hybridisierung musste die Membran zunächst gewaschen werden um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle von der Membran zu entfernen. Dies erfolgte zunächst in 2 x SSC/0,1 % SDS 5 Minuten bei RT, anschließend jeweils 15 Minuten in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bzw. 0,2 x SSC/0,1 % SDS im Wasserbad bei 65 °C bei konstantem, leichtem, vertikalem Schwenken. So wurde schrittweise die Stringenz des Waschens erhöht, so dass nur spezifisch gebundene Sondenmoleküle am nachzuweisenden Konstrukt an der Membran verbleiben konnten. Um die Membran nun auf die Immunodetektion vorzubereiten, wurde diese zunächst kurz in 1 x Waschpuffer (ohne Tween) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 30' in 1 x Blockingreagenz (Roche Diagnostic GmbH) geblockt, wobei unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran blockiert wurden. Schließlich wurde das 1 x Blockingreagenz ausgetauscht, der Anti-DIG-Antikörper zugegeben (1:10.000 im Verhältnis zu Blockingreagenz) und eine weitere Stunde geschwenkt. Anschließend wurde unspezifisch gebundener Antikörper durch Waschen der Membran 3 x 15' in 1 x Waschpuffer (mit 0,3 % Tween20) entfernt. Nach Äquilibrieren der Membran 2' in 1 x Substratpuffer, konnte diese auf Klarsichtfolie aufgelegt, die CSPD Lösung (CDP-Star, Roche Diagnostic GmbH) aufgetropft und die Membran vollständig eingeschweißt werden. CSPD diente als Substrat für die an den Anti-DIG-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase. Bei Umsetzung des

Substrats kommt es zur Freisetzung von Chemilumineszenz, die anschließend zur Schwärzung eines Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) führt, der auf die eingeschweißte Membran aufgelegt wurde. Die Stärke der Schwärzung korreliert dabei direkt mit der Menge an vorhandenen Nukleinsäurekopien. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte in einer Kassette bei 37 °C für 5-60'. Die anschließende Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mit Hilfe von Fixierer und Entwickler der Firma Kodak.

10 x Waschpuffer

Maleinsäure	1	M
NaCl	1,5	M
NaOH		

10 x Substratpuffer

Tris	0,1	M
NaCl	0,15	M

pH auf 9,5 einstellen

2.15 Transiente Genexpression in *N. benthamiana* und *N. tabacum*

2.15.1 Kultivierung und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die transiente Transformation von *N. benthamiana* und *N. tabacum* wurde von *A. tumefaciens* vermittelt. Dieses Bakterium stellt einen natürlichen Transformationsvektor für Pflanzen dar, indem es DNA innerhalb der auf einem Plasmid befindlichen so genannten TDNA-Region, in die Pflanzenzelle einschleusen kann. Dort integriert dieses DNA-Fragment in das Genom und kann transkribiert werden. Für transiente Transformation von *N. benthamiana* und *N. tabacum* wurden chemisch kompetente *A. tumefaciens* des Stammes C58C1 verwendet. Dieser Stamm enthält das Plasmid pGV2260, das Rifampicin- und Carbenicillinresistenz vermittelt. Konstrukte für die transiente Genexpression in Tabak wurden in pB7WG2 kloniert und anschließend in C58C1 transformiert.

Zur Transformation von *A. tumefaciens* wurden die in Aliquots von 20 µL bei -80 °C gelagerten chemisch kompetenten Zellen mit 0,5-1 µg Plasmid versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 5' bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, wobei der Ansatz nach der Hälfte der Zeit durch Schnipsen gegen das Gefäß durchmischt wurde. Zur Regeneration der Zellen wurde 500 µL YEB-Medium hinzugefügt und bei 28 °C mind. zwei Stunden geschüttelt. Die regenerierten Zellen wurden schließlich auf Rifampicin, Carbenicillin, Streptomycin und Spectinomycin (alle 50 µg/mL) ent-

haltende YEB-Platten ausplattiert. Von Kolonien, die 2-3 Tagen nach der Transformation sichtbar waren, wurde auf neue Platten überimpft und mit Kolonie-PCR auf Vorhandensein des Plasmids überprüft.

Die Kolonie-PCR wurde mit der Silverstar *Taq*-Polymerase (EuroGenTec) in einem 20 μ L-Ansatz durchgeführt, wobei als Template direkt die zu testenden Kolonie eingesetzt wurde, indem mit einer Pipettenspitze erst in die Kolonie gepickt und anschließend durch den fertigen PCR-Ansatz gerührt wurde:

Silverstar <i>Taq</i> -Polymerase	0,2	μ L
Silverstar Puffer	2	μ L
dNTPs [2 mM]	2	μ L
MgCl ₂ [50 mM]	0,6	μ L
Primer pAMPAT-check_F [10 pmol/mL]	1	μ L
Primer pB7WG2_F [10 pmol/mL]	1	μ L
Aq _{reinst}	13,2	μ L

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

95 °C	3''		} 30x
98 °C	10''	(Denaturierung)	
60 °C	30''	(Annealing)	
72 °C	15''/kb	(Elongation)	
72 °C	5''		
10 °C	∞		

Kulturen von *A. tumefaciens* wurden in Röhren aus Glas in 2 mL YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika ca. 20 Stunden im 28 °C-Schüttler (Gallenkamp) bei 210 rpm angezogen. Zur längerfristigen Lagerung wurden Glycerolstocks angelegt. Hierzu wurden 900 μ L Übernachtskultur und 100 μ L steriles Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren, Glycerolstocks wurden bei -80 °C gelagert.

YEB-Medium

Beef Extract	5 g L ⁻¹
Yeast Extract	1 g L ⁻¹
Peptone 140	5 g L ⁻¹
Sucrose	5 g L ⁻¹

2.15.2 Tabakinfiltration

Die Tabakinfiltration wurde nach einem Protokoll von Jochen Kleemann (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) durchgeführt (Kleemann et al., 2012). Alle Klonierungsschritte zur Generierung von Konstrukten zur transienten Expression in Tabak wurden mit Hilfe der Gateway®-Klonierung hergestellt (s. 2.12.6). Der Entry-Clone zu den Genen *ChEC3* und *ChNLP1* aus *C. higginsianum*, sowie *YFP*, wurde jeweils freundlicherweise von J. Kleemann zur Verfügung gestellt.

Zur transienten Expression in Tabak wurden Kulturen von *A. tumefaciens* mit entsprechenden Konstrukten ca. 20 Stunden in Flüssigkultur angezogen und nach dieser Zeit die Bakterienzellen in Infiltrationspuffer aufgenommen ($OD_{600} = 1$). Der Infiltrationspuffer enthielt dabei Acetosyringon, welches als natürlicher Botenstoff bei pflanzlichen Verwundungen ausgeschüttet wird und die Transformationsfähigkeit der Bakterien positiv stimuliert. Die Bakterienzellen wurden 2-3 Stunden unter Schütteln (ca. 100 rpm) in Infiltrationspuffer inkubiert und die nach Ablauf der Inkubationszeit fertige Bakteriensuspension in die Unterseite Tabakblättern, welche zuvor mindestens eine Stunde unter feuchten Plastikhauben platziert wurden, infiltriert. Die Infiltration geschah mit Hilfe von Plastikspritzen ohne Nadel (Omnifix-F, B. Braun Melsungen AG). Infiltrationsstellen besaßen einen Durchmesser von ca. 2 cm.

10 x Infiltrationspuffer

MES	100	mM
MgCl ₂	100	mM
Acetosyringon	200	µM

pH mit NaOH auf 5,6 einstellen

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Identifizierung von Kandidatengenenen für Effektoren von *M. oryzae*

Effektoren und AVR-Proteine von *M. oryzae* wurden bislang hauptsächlich in der Interaktion mit Reis beschrieben (Mosquera et al., 2009; Saitoh et al., 2012; Chen et al., 2013b). Im Gegensatz dazu wurden in unserer Arbeitsgruppe, im Rahmen der Dissertation von Rhoda Delventhal (2015), meiner Diplomarbeit (2010) und der vorliegenden Dissertation, Effektorproteine, die während der *M. oryzae*- Gerste-Interaktion eine Rolle spielen, untersucht. Diese so genannten *MoHEGs* (engl. *Magnaporthe oryzae Hypothetical Effector Genes*) wurden im Rahmen dieser Arbeit genauer analysiert.

3.1.1 Microarray Studie zur Identifizierung putativer Effektorkandidaten

Es wird allgemein angenommen, dass pathogene Effektorproteine Wirtszellen manipulieren, um eine kompatible Pathogen-Wirt-Interaktion (Wirtinteraktion) zu ermöglichen. Daraus folgt die Annahme, dass entsprechende Effektoren in der Nichtwirtinteraktion fehlen oder verspätet exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde in einer 2009 durchgeführten, vergleichenden Microarray Studie das Transkriptom der Wirtinteraktion mit dem der Nichtwirtinteraktion zwischen Gerste und verschiedenen Arten der Gattung *Pyricularia*, verglichen (Rhoda Delventhal, Dissertation, 2015). Als Wirtisolat wurde dabei das *M. oryzae* Isolat TH6772, als Nichtwirtisolat das *P. penniseticola* Isolat CD180 verwendet.

Da *M. oryzae* bei einer Inokulation der Blätter zunächst über die Epidermis in die Wirtpflanze eindringt, wurde die für das Microarray Experiment verwendete RNA zu 24 h p.i. aus Epidermisproben inokulierter Gerste extrahiert, um, im Vergleich zu Ganzblattproben, pilzliche RNA gegenüber pflanzlicher RNA anzureichern (Rhoda Delventhal, 2009). Es wurde darüber hinaus eine hohe Inokulationsdichte von 750.000 Sporen pro mL eingesetzt, so dass schließlich 10 % pilzliche RNA, im Vergleich zu pflanzlicher RNA, in den für den Microarray verwendeten Proben vorhanden war (Rhoda Delventhal, Dissertation, 2015). Das Experiment wurde mit vier unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckhard Thines am IBWF Kaiserslautern wurde das Microarray Experiment mit einem Chip der Firma Agilent (*Magnaporthe* (V2) Gene Expression Microarray 4 x 44K slide [Design ID 15060]) und einer Two-Color-Analyse (Quick Amp Labeling) durchgeführt und ausgewertet. Auf dem Chip waren 15170 Oligonukleotide, die für *M. oryzae*- Gene charakteristisch sind, gespottet. Da Gene gefunden werden sollte, die in der Nichtwirtinteraktion im Vergleich zur Wirtinterakti-

on nicht oder verspätet exprimiert werden, wurde zunächst die Signalstärke zwischen Wirt- und Nichtwirtinteraktion bei jedem gespotteten Oligonukleotid verglichen und auf Signifikanz geprüft (Karsten Andresen, IBWF Kaiserslautern, 2009). Anschließend wurden bestimmte Kriterien auf die Auswahl der Effektorkandidatengene angewendet (Rhoda Delventhal, 2009). Da Effektorgene gesucht wurden, die für die Wirtinteraktion von *M. oryzae* essentiell sind, wurden nur die Gene weiter betrachtet, die mit einem p-Wert $\leq 0,05$ signifikant und mindestens zweifach höher im Wirtisolat exprimiert waren als im Nichtwirtisolat (Fold change ≥ 2). Dabei handelte es sich um 1528 Gene. Es wurde weiterhin davon ausgegangen, dass die gesuchten Effektoren sekretiert werden, um in der Wirtzelle zu wirken. Daher wurden, nach einer Analyse durch SignalP (Petersen et al., 2011) und WoLF PSORT (Horton et al., 2007), nur die Gene weiter betrachtet, die ein Signalpeptid besaßen (358 Gene). Darüber hinaus wurden Gene ausgesucht, die für relativ kleine Proteine kodieren (≤ 250 Aminosäuren), da angenommen wird, dass Effektoren kleinen Proteinen oder gar Peptiden entsprechen (Hogenhout et al., 2009; Giraldo and Valent, 2013). So wurden schließlich 157 Effektorkandidaten erhalten. Eine vollständige Liste dieser Kandidaten befindet sich im Anhang der Dissertation von Rhoda Delventhal (2015).

Eine Analyse, bei der die Positionen einzelner Gene auf den einzelnen Chromosomen des *M. oryzae* Genoms grafisch dargestellt werden (ensemble.org), wurde von allen 157 putative Effektorgenen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die *MoHEGs* bis auf Einzelfälle nicht benachbart oder in bestimmten Regionen im Genom lokalisiert sind (engl. cluster, nicht gezeigt).

Im Rahmen einer Microarray Studie aus dem Jahr 2009, wurden 58 Kandidaten für Effektorproteine aus infizierten Reisblattscheiden veröffentlicht, die ausschließlich während Pathogen-Wirt-Interaktion exprimiert werden (Mosquera et al., 2009). Interessanterweise befanden sich unter den hier ermittelten 157 putativen Effektorkandidaten, 29 Sequenzen, die in dieser Studie ebenfalls als differenziell reguliert im Vergleich zu Mycel, gefunden wurden. Die aus dieser Studie bekannten *BAS* (engl. *biotrophy-associated-secreted*) Gene *BAS1*, *BAS3* und *BAS4* (Mosquera et al., 2009) wurden ebenfalls unter den 157 Kandidatengenen gefunden. Darüber hinaus wurden das bekannte *M. oryzae* Effektorgen *PWL2* (Sweigard et al., 1995) und das Gen für MoNLP1 (*M. oryzae* Nep1-like protein1), das Zelltod in *N. benthamiana* induziert (s. 3.3) detektiert. Auch das für eine sekretierte NUDIX Hydrolase kodierende Gen MoNUDIX wurde unter diesen 157 Kandidatengenen gefunden (s. 3.5).

3.1.2 Auswahl von *MoHEGs* (*Magnaporthe oryzae* Hypothetical Effector Genes)

Die Anzahl von 157 putativen Effektorgenen wurde zur näheren Analyse auf 18 *MoHEGs* (*Magnaporthe oryzae* Hypothetical Effector Genes) reduziert. Da alle 157 putativen Effektorgene unseren Kriterien eines Effektorkandidaten entsprachen, geschah die Auswahl der 18 *MoHEGs* größtenteils willkürlich, berücksichtigte jedoch teilweise hohe Fold Change oder Anzahl der Cysteinreste des korrespondierenden Proteins (s.u.). Alle 18 *MoHEGs* sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5 enthält, neben der Arrayidentifikationsnummer (AMG Nummer), die dieser zugeordneten Gennummer (MGG Nummer) aus dem 6. Assembly des veröffentlichten *M. oryzae* Genoms (Datenbank des Broad Institute (Dean et al., 2005)). Darüber hinaus sind die Anzahl der Aminosäuren (AS) des korrespondierenden Proteins und die darin enthaltenen Cysteinreste angegeben, da einige *MoHEGs* auf Grund des hohen Cysteingehaltes des korrespondierenden Proteins in die Liste der 18 *MoHEGs* aufgenommen wurden (*MoHEG3*, *MoHEG13* und *MoHEG15*). Der in Spalte fünf angegebene Locus des jeweiligen *MoHEGs* im *M. oryzae* Genom wurde mit Hilfe der MGOS Datenbank (engl. *Magnaporthe grisea* / *Oryza sativa* interaction database) ermittelt (www.mgosdb.org). Nach dieser Analyse wurde deutlich dass *MoHEG11* in Nachbarschaft zu *MoHEG13* auf Chromosom IV liegt. Die in der sechsten Spalte angegebene Fold Change beschreibt, um wie viel das Gen während der Wirtinteraktion zwischen TH6772 und Gerste stärker exprimiert war, als während der Nichtwirtinteraktion zwischen CD180 und Gerste. Sie stellte das wichtigste Kriterium für die weitere Auswahl der *MoHEGs* dar, da Effektorproteine gesucht wurden, die in der Wirtinteraktion im Vergleich zur Nichtwirtinteraktion hochreguliert sind. Besonders hoch erschien die Fold Change z.B. bei *MoHEG4*, *MoHEG5* oder *MoHEG6*.

Bei Literaturrecherchen wurde zu Beginn und im Verlauf dieser Dissertation deutlich, dass einige *MoHEGs* auch in Zusammenhang mit anderen Studien, welche die *Magnaporthe*-Reis-Interaktion betreffen, detektiert werden konnten (Tabelle 5, Spalte 7). Diese Überschneidungen werden in Kapitel 4.1 ausführlich diskutiert. Zu diesen anderen Studien, in denen ebenfalls *MoHEGs* detektiert werden konnten, gehörte entsprechend die bereits o.g. Microarray Studie von inokulierten Reisblattscheiden (Mosquera et al., 2009). Weiterhin wurde eine Microarray Studie, in der das Transkriptom während Wachstum *in planta* und unter Stressbedingungen *in vitro* verglichen wurde, durchgeführt (Mathioni et al., 2011). In zwei weiteren, aufeinander folgenden Studien, wurden zunächst sekretierte Proteine, die durch bestimmte angewendete Kriterien als Effektorkandidaten in Frage kamen, innerhalb des veröffentlichten *M. oryzae*-Genom bestimmt (Yoshida et al., 2009). Anschließend wurde deren Expression während *M. oryzae*-Reis-Interaktion untersucht und Kandidatengene im großen Stil durch KO-Mutanten funktional ana-

lysiert (Saitoh et al., 2012). Darüber hinaus wurden in einer MPSS (engl. Massively Parallel Signature Sequencing) Studie das Transkriptom in Mycel und während Appressorienbildung verglichen (Gowda et al., 2006). Schließlich wurde *MoHEG10* erst kürzlich als Avirulenzeffektor Avr-Pi9 identifiziert (Wu et al., 2015).

In der vorletzten Spalte der Tabelle sind schließlich die Annotation und Kommentare der MGOS Datenbank angegeben. Während MoHEG1, MoHEG2, MoHEG8, MoHEG11 und MoHEG12 hier bereits als BAS Proteine annotiert sind (Mosquera et al., 2009), sind alle anderen MoHEGs, mit Ausnahme von MoHEG10, vorhergesagte oder hypothetische Proteine ohne bekannte funktionale Domänen. Darüber hinaus wurden KO-Mutanten von *MoHEG13* bereits analysiert (Saitoh et al., 2012). Hierbei konnten in Bezug auf Keimung, Konidien- und Appressorienbildung, sowie Penetration, invasives Wachstum und Pathogenität keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (http://www.mgosdb.org/perl/community/annotation.cgi?uniquename=MC_09378).

In der letzten Spalte sind schließlich sonstige Merkmale der MoHEGs zusammengefasst. Dazu gehören beispielsweise Proteindomänen oder -motive. So wurden MoHEG16, MoHEG17 und MoHEG18 für die nähere Analyse ausgewählt, da sie das Motiv Y/F/WxC innerhalb der ersten 30 Aminosäuren des reifen Proteins, d.h. hinter dem Signalpeptid, enthalten (s. Abbildung 6, S. 56). Dieses Motiv kommt in sekretierten putativen Effektorproteinen des Echten Gerstenmehltaus vor (Godfrey et al., 2010; Spanu et al., 2010), darüber hinaus wurde es ebenfalls innerhalb des Sekretoms von Haustorien bildenden Rostpilzen, d.h. dem Weizenschwarzrost und dem Weizenbraunrost, gefunden (Godfrey et al., 2010). MoHEG16 enthält außerdem eine CFEM (engl. Common in several Fungal Extracellular Membrane proteins) Domäne (PFAM Domäne PF05730). Diese konservierte, Pilz-spezifische und membrandurchspannende Domäne enthält acht Cysteinreste. Proteine, die eine solche CFEM Domäne enthalten, werden mit einer Rolle in pilzlicher Pathogenese in Verbindung gebracht (Kulkarni et al., 2003).

Tabelle 5: Liste der *M. oryzae* Hypothetical Effector Genes (MoHEGs).

MoHEG ^a	Array ID ^b	Gen ID ^c	Lokus ^d	AS (Cys) ^e	Faktor ^f	bekannt aus Reinsinteraktion ^g	MGOS Annotation ^h	Sonstiges ⁱ
1	AMG12560	MGG_11610	VI: 3,454,688	113 (10)	9,00	Mosquera et al., 2009; Mathioni et al., 2011	BAS3	Pfam: Gamma-Thionin
2	AMG15980	MGG_10914	VI: 236,698	102 (8)	13,36	Mosquera et al., 2009	BAS4	
3	AMG02439	MGG_08399	I: 7,639,698	128 (8)	14,32	Mosquera et al., 2009	predicted	Pfam: CVNH
4	AMG08263	MGG_14965	IV: 4,093,668	208 (5)	24,25	Mosquera et al., 2009	predicted BAS	Duplikat MGG_15371 (VII: 234,746)
5	AMG11831.2	MGG_00737	VI: 1,853,753	150 (5)	22,63		hypothetical	Pfam: Flocculin_t3
6	AMG07169	MGG_08506	V: 846,344	172 (2)	19,97		predicted	
7	AMG13624.2	MGG_09055	VII: 2,018,526	206 (4)	12,21	App-spezifisch, MPSS Daten, Gowda et al., 2006	hypothetical	
8	AMG08432	MGG_09387	VI: 3,535,091	219 (0)	11,88	Mosquera et al., 2009	predicted BAS	
9	AMG12924	MGG_00043	VI: 4,510,713	131 (5)	11,31	Mosquera et al., 2009	predicted	
10	AMG13916	MGG_12655	VII: 2,719,905	109 (5)	10,13	Wu et al., 2015	predicted	AvrPI9, Pfam: zf-HIT, Zn_ribbon_recom
11	AMG08417.1/.2	MGG_09379	IV: 3,567,509	121 (4)	7,57	Mosquera et al., 2009	predicted BAS	
12	AMG08859	MGG_06224	V: 4,531,287	134 (4)	6,50	Mosquera et al., 2009	predicted BAS	
13	AMG08416.1	MGG_09378	IV: 3,570,131	72 (7)	6,45	Mosquera et al., 2009; Saitoh et al., 2012	hypothetical	
14	AMG02925	MGG_02239	II: 1,265,144	171 (2)	6,63	Mosquera et al., 2009; Mathioni et al., 2011	conserved	Pfam: DUF3237
15	AMG06832.1	MGG_07969	III: 6,459,249	101 (6)	6,82		hypothetical	Pfam: Gamma-Thionin
16	AMG11262.1	MGG_01149	VI: 369,292	148 (8)	10,13		conserved	
17	AMG04678	MGG_07411	III: 545,063	102 (8)	4,56		hypothetical	Pfam: CFEM, Y/F/WxC
18	AMG14720	MGG_10282	VII: 4,399,174	125 (2)	2,93		hypothetical	Pfam: Prolamin_like, Y/F/WxC

^afortlaufende Nummer des MoHEGs^bIdentifikationsnummer (Oligonukleotidsonde) des Microarrays (Agilent *Magnaporthe* [V2] Gene Expression)^cdie der Oligonukleotidsonde zugeordnete Genidentifikationsnummer der Broad Datenbank (6. Assembly)^dLokalisation innerhalb des Magnaporthe Genoms (Broad Datenbank, 6. Assembly)^eAnzahl der Aminosäuren des korrespondierenden Proteins inklusive der enthaltenen Cysteinreste^fFaktor (engl. fold change), um den das Transkript während der Wirtinteraktion im Vergleich zur Nichtwirtinteraktion stärker exprimiert wurde^gVeröffentlichte Studien, in denen entsprechende Gen ID ebenfalls zu finden ist^hAnnotation der MGOS DatenbankⁱProteindomäne oder -motiv, andere Besonderheiten

3.1.3 Transkriptabundanzanalysen der *MoHEGs* durch RT-qPCR

Nach der Auswahl von 18 *MoHEGs*, wurde deren Induktion während der Wirtinteraktion durch RT-qPCR validiert. So sollten die Ergebnisse des Microarray Experiments bezüglich der Genexpression überprüft werden. Darüber hinaus sollten die Expressionsprofile die *MoHEGs* im zeitlichen Verlauf der kompatiblen Interaktion erfasst werden. Entsprechend wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten die Gerstensorte Ingrid mit dem Wirtisolat TH6772 inokuliert und Epidermisproben zu 6, 12, 24 und 48 h p.i. geerntet. Nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurde jeweils eine RT-qPCR Analyse durchgeführt (erstes Experiment im Rahmen meiner Diplomarbeit, 2010). Schließlich wurde eine vierte und fünfte Zeitreihe, die ausschließlich bzw. zusätzlich spätere Zeitpunkte des Lebenszyklus von *M. oryzae* miteinschlossen, geerntet. Das bedeutet, dass für die letzte komplette Zeitreihe, die entsprechend biotrophe und nekrotrophe Lebensphase von *M. oryzae* umfasste, zu 7 verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 h p.i.) Epidermisproben geerntet und durch RT-qPCR analysiert wurden (s. Abbildung 4). In allen biologischen Replikaten wurde jeweils für jedes *MoHEG* ein ähnliches Expressionsprofil erhalten.

Als konstitutive Referenzgene dienten α -Tubulin und *EF1 α* (*Elongationsfaktor1 α*). Die Auswahl der Referenzgene wurde mit Hilfe der Software geNorm getroffen (Version 3.5, Diplomarbeit, 2010) und genspezifische Primer durch Erstellen von Standardkurven validiert, wobei durch eine Verdünnungsreihe ermittelt wurde, ob das Verhältnis zwischen Produktakkumulation und Zykluszahl der PCR linear war. Dabei konnten für *MoHEG10* und *MoHEG15* keine geeigneten Primerpaare gefunden werden, weswegen für *MoHEG10* und *MoHEG15* keine Expressionsprofile erstellt werden konnten (vgl. Diplomarbeit, 2010).

Alle untersuchten *MoHEGs* besaßen die maximale Transkriptabundanz in der biotrophen Entwicklungsphase des Pilzes, wurden aber innerhalb dieser in zwei Gruppen differenziert, je nachdem ob die maximalen Transkriptabundanz in der prä-Penetrationsphase bzw. Penetrationsphase oder in der post-Penetrationsphase bzw. Kolonisierungsphase detektiert werden konnte (s. Abbildung 4). So wurden als Frühe *MoHEGs* die Kandidaten bezeichnet, deren maximale Transkriptabundanz zu 0, 6 oder 12 h p.i. detektiert wurde. Zu diesen Zeitpunkten befindet sich *Magnaporthe* auf der Blattoberfläche des Wirtes und beginnt diese zu penetrieren. Als Späte *MoHEGs* wurden dagegen solche bezeichnet, deren maximale Transkriptabundanz zu 24 oder 48 h p.i. detektiert wurde. Zu diesen Zeitpunkten wird oder ist die Pathogen-Wirt-Interaktion etabliert und der Wirt wird kolonisiert. Entsprechend wurden *MoHEG5*, *MoHEG7*, *MoHEG16*, *MoHEG17* und *MoHEG18* als Frühe *MoHEGs* (in Abbildung 4 mit weißen Balken dargestellt), alle anderen dagegen als Späte *MoHEGs* bezeichnet (in Abbildung 4 mit schwarzen Balken darge-

stellt). Frühen *MoHEGs* könnte entsprechend eine Rolle während der Konidienkeimung, Appressorienbildung oder der Penetration zufallen. Späte *MoHEGs* dagegen könnten bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Interaktion oder Infektion eine Aufgabe erfüllen.

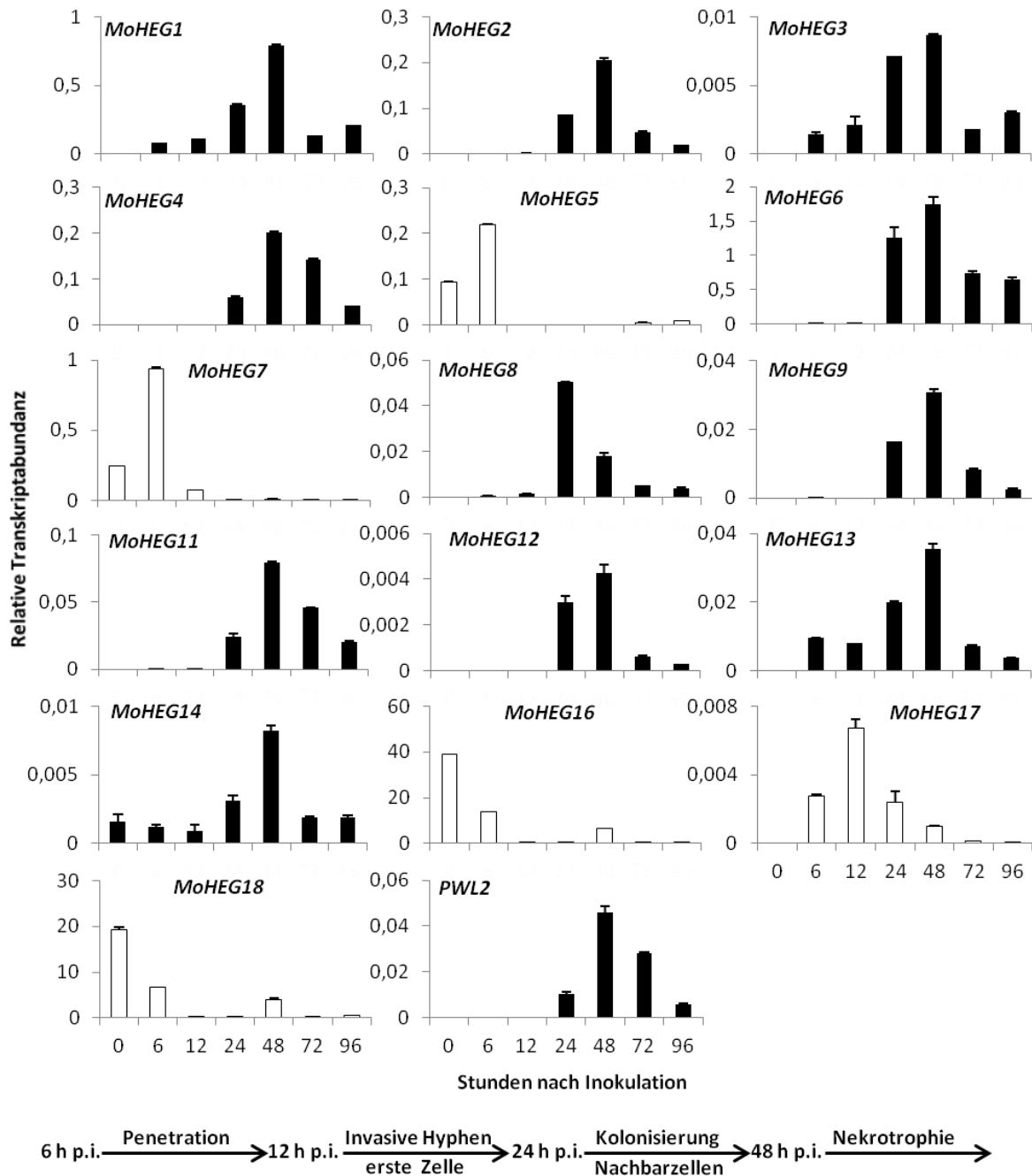


Abbildung 4: Expressionsprofile der *MoHEGs*. Gerstenpflanzen der Sorte Ingrid wurden mit dem *M. oryzae* Wirtisolat TH6772 inokuliert (750.000 Sporen/mL) und die Epidermis von ca. 10-20 Primärblättern nach 0, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 h p.i. geerntet. Die Pilzentwicklung ist im zeitlichen Verlauf durch einen Zeitstrahl angedeutet. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden durch RT-qPCR-Analyse die Transkriptabundanz der *MoHEGs* und *PWL2* relativ zu dem konstitutiv exprimierten Gen *EF1 α* mit Hilfe gen-spezifischer Primer bestimmt. Weiße Säulen heben Frühe *MoHEGs* hervor, schwarze Säulen stellen Späte *MoHEGs* dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate. Dieser Versuch wurde mehrmals durchgeführt (siehe Text).

Zusätzlich wurde ein Expressionsprofil des bekannten *Magnaporthe* AVR Effektors *PWL2* mit den für die RT-qPCR Analysen verwendeten Proben erstellt (Sweigard et al., 1995). Dabei fällt auf, dass *PWL2* in den hier verwendeten Proben ein Expressionsprofil mit spätem Expressionsmaximum (entspricht dem eines Späten *MoHEGs*) besaß.

3.1.3.1 Expressionsanalyse in *in vitro* gekeimten Konidien

In einer weiteren RT-qPCR-Analyse sollte geklärt werden, ob die *MoHEGs* auch unabhängig von der Gegenwart der Wirtspflanze, also auch *in vitro*, exprimiert werden. Dazu wurden Konidien des Wirtisolates TH6772 in einer feuchten Kammer auf Glasplatten zum Keimen angeregt. Nach 5 h wurden die mit Keimschläuchen ausgekeimten Konidien geerntet. Bei der anschließenden Transkriptabundanzanalyse stellte sich heraus, dass zu 5 h ausschließlich Transkripte der Frühen *MoHEGs*, mit Ausnahme von *MoHEG17*, detektierbar waren (Abbildung 5). Späte *MoHEGs* wurden entweder nicht detektiert (n.d.) oder mit einem geringen basalen Level. Eine Ausnahme stellt dabei die Expression von *MoHEG17* dar. Diese Ergebnisse konnten in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden.

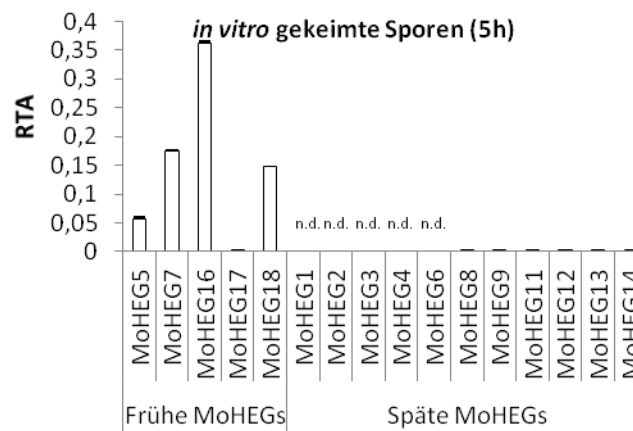


Abbildung 5: Relative Transkriptakkumulation der *MoHEGs* in *in vitro* gekeimten Sporen. Konidien des *M. oryzae* Isolat TH6772 wurden auf Glasplatten aufgesprüht und in einer Kammer mit 100 % Luftfeuchtigkeit 5 h keimen gelassen. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden mit Hilfe von RT-qPCR die Transkriptabundanz der *MoHEGs* relativ zu dem konstitutiven exprimierten Gen *EF1 α* mit Hilfe Gen-spezifischer Primer bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate. Von diesem Versuch wurde ein unabhängiges biologisches Replikate mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. RTA: relative Transkriptabundanz.

3.2 Funktionale Analyse von *MoHEGs* durch Gen-Deletion

Durch das gezielte Ausschalten oder Überexprimieren individueller Gene kann die Ausprägung eines veränderten Phänotyps gegebenenfalls ein direkter Rückschluss auf die Funktion des korrespondierenden Proteins gezogen werden. Die funktionale Analyse wird im Fall des gezielten Ausschaltens eines Gens in filamentösen Ascomyceten durch Homologe Rekombination erreicht. Obwohl Protokolle zur Transformation bzw. Transfektion von *M. oryzae* veröffentlicht sind, musste diese Methode zunächst im Labor etabliert werden.

Besonders interessant schien zunächst die funktionale Analyse der Frühen *MoHEGs*, da über früh regulierte Effektoren in *Magnaporthe* bislang noch nicht viel bekannt ist. Die Frühen *MoHEGs* *MoHEG16*, *MoHEG17* und *MoHEG18* schienen dabei besonders interessant, da sie das Motiv Y/F/WxC innerhalb der ersten 30 Aminosäuren des reifen Proteins, d.h. hinter dem Signalpeptid, enthalten (Abbildung 6). *MoHEG16* gehört darüber hinaus zur CFEM Superfamilie (engl. common in several fungal extracellular membrane proteins). Proteine dieser Familie enthalten eine charakteristische Domäne mit 8 Cysteinreste (s. 3.1.2).

```
>MoHEG16
MQLLFALLMAAVLVAAQSGSYGSNIDGLISQVPQCA[FNC]AEAAESSCGLTDIRCMCGRISLVSGTSSTCLSKA
CSADQLATLSSTISKVCADVGAPDPAAAKTATSNDTVPAAASAVPTPSQTAVATRLKLMATVAMFAALSVNIV*
>MoHEG17
MLYKLAAVVLASSFVSTASAAFN[FYC]PGVNATGFYPSCCRGITGQVGVDCEFAHLIGGLPNFECNIGPPNNQRG
CCQSINYTNPNTGYRLSLCTDTTAYPPV*
>MoHEG18
MHSASFLATAVIAGMASPVLAVLALPADPAPAPAPVRPV[FGC]VRMSIVTTDKDSTSINSGDLIPTTNPQQVDFK
DGSdTITVKLDKNCQPVGNIKHRKEVQFNALQKLTKNGGPFTDPDQPFITF*
```

Abbildung 6: MoHEGs mit Y/F/WxC Motiv. Die Proteine *MoHEG16*, *MoHEG17* und *MoHEG18* enthalten innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem Signalpeptid (graue Schrift) ein Y/F/WxC Motiv (schwarzer Kasten).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Homologe Rekombination *MoHEG16* und *MoHEG18* deletiert und die so erhaltenen Mutanten nach Inokulation während der Interaktion mit der Gerstensorte Vada im Vergleich zum Wildtyp mikroskopisch analysiert. Die Gerstensorte Vada war für eine solche Analyse besonders gut geeignet, da invasive Hyphen licht- und fluoreszenzmikroskopisch besonders gut zu erkennen waren, wie in einem Vorversuch mit verschiedenen Gerstensorten ermittelt wurde (nicht gezeigt).

3.2.1 Generierung von Deletionsmutanten in *M. oryzae*

Für die stabile Transformation von *M. oryzae* sind zwei grundsätzlich zu unterscheidende Methoden bekannt, die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation und die PEG vermittelte Transformation. Da durch erstere Methode keine Transformanden erhalten werden konnten, wurde letztere Methode nach dem Protokoll des Labors von Prof. Nicholas J. Talbot (Exeter University, UK) etabliert.

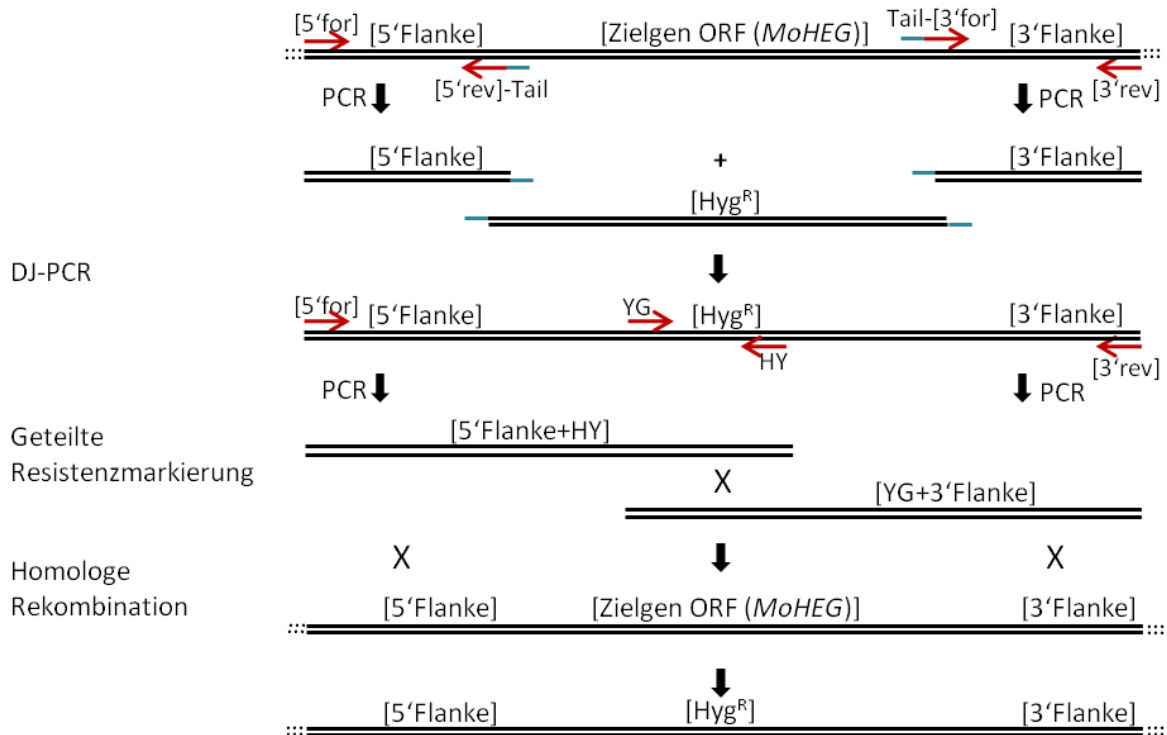


Abbildung 7: Vorgehensweise zur Erzeugung von Deletionsmutanten in *M. oryzae*. Zum gezielten Ausschalten von *MoHEGs* wurde hier schematisch dargestellte Vorgehensweise gewählt: Zunächst wurden 5' und 3' Flanke des jeweiligen auszuschaltenden *MoHEGs* mit spezifischen Primern amplifiziert, dabei besaßen die inneren Primer (5' rev und 3' for) jeweils einen spezifischen Überhang. In einer separaten PCR wurde die Hygromycinresistenz vermittelnde Expressionskassette (Hyg^R) amplifiziert, wobei Primer spezifische zu 5' bzw. 3' Flanke komplementäre Überhänge generierten. In der anschließenden Double Joint PCR (DJ-PCR) wurden 5' Flanke, Hyg^R und 3' Flanke fusioniert. Das so entstandene KO-Konstrukt wurde in zwei PCRs amplifiziert, so dass zwei „Hälften“ des KO-Konstrukts erhalten wurden („5' Flanke+HY“ und „YG+3' Flanke“, Geteilte Resistenzmarkierung). Beide „Hälften“ wiesen dabei einen überlappenden Bereich in der Mitte auf und wurden für die Homologe Rekombination eingesetzt. Nur bei Integration beider „Hälften“ am Ziellokus konnte entsprechend eine intakte Hyg^R erhalten werden.

Das Ersetzen von Genen mit Resistenzkassetten an gezielten Genorten (Loci) durch doppelten crossover (engl. Überschneidung) erfordert relativ lange homologe Bereiche der das Gen flankierenden Region von ca. 1000 bp (Flanken). Diese Bereiche müssen mit einer Resistenz vermittelnden Genkassette zu einem so genannten KO (Ausschalten, engl. knock-out)-Konstrukt fusioniert werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Double-joint PCR (Yu et al., 2004) durchgeführt. Um die Generierung von falsch positiven Mutanten gering zu halten wurde

anschließend zusätzlich die Split Marker Methode (engl. geteilte Resistenzmarkierung) angewendet (Catlett et al., 2003). Hierbei wird das KO-Konstrukt in zwei Hälften amplifiziert und in die Transformationsreaktion eingesetzt, so dass beide Hälften am Ziellocus inserieren müssen um die funktionale Resistenzkassette zu erhalten. Transformiert wurden in der vorliegenden Arbeit protoplastierte *M. oryzae* Zellen und die Transformationsreaktion wurde durch PEG (Polyethylenglycol) vermittelt. Eine Übersicht über die Vorgehensweise zur Erzeugung von KO-Mutanten ist in Abbildung 7 dargestellt.

Als *M. oryzae* Isolat für die funktionale Analyse wurde das sequenzierte Isolat 70-15 ausgesucht, da das Transformationsprotokoll auf dieses Isolat zugeschnitten war und es in unseren Händen zuverlässig Rice-Blast-Symptome auf allen getesteten Gerstensorten verursachte. Sequenzen der ein Gen flankierenden Regionen sind außerdem nur bei diesem Isolat öffentlich zugänglich und können sich bei anderen *M. oryzae* Isolaten unterscheiden.

3.2.2 Funktionale Analyse von *MoHEG16*

Nach positiver Selektion mit entsprechenden Antibiotika, wurde die DNA putativer Transformanden isoliert und eine spezifische PCR zur Verifizierung des Genotyps durchgeführt. Dazu wurden spezifische Primer so gewählt, dass ausschließlich dann PCR-Produkte generiert werden konnten, wenn die Integration des KO-Konstruktes am Ziellocus erfolgreich war. Die so genotypisch verifizierten Mutanten wurden in einem Pathogenitätsassay vergleichend mit dem entsprechenden Wildtyp (*M. oryzae* Isolat 70-15) makroskopisch und mikroskopisch auf einen veränderten Phänotyp analysiert.

3.2.2.1 Genotypische Analyse der $\Delta moheg16$ KO-Mutanten

Die spezifischen Primer zur Verifizierung des Genotyps putativer $\Delta moheg16$ KO-Mutanten wurden so gewählt, dass einer der beiden Primer innerhalb der kodierenden Sequenz und der andere Primer innerhalb der ersten 1000 bp der das Gen flankierenden Sequenz hybridisieren konnte. War nun das Wildtypallel durch Homologe Rekombination ersetzt worden, konnte kein Produkt generiert werden. Nur wenn Wildtypgen und daran anschließende flankierende Sequenz noch vorhanden waren, wurde entsprechend ein Produkt erhalten. Als Kontrolle wurde eine zusätzliche PCR auf ein anderes Wildtypgen, *PMK1*, durchgeführt um die generelle Eignung der extrahierten DNA als PCR-Template zu überprüfen. Die Ergebnisse beider PCRs sind in Abbildung 8 dargestellt, dabei zeigt Teilabbildung A die Kontroll-PCR, Teilabbildung B die PCR auf das Wildtypgen *MoHEG16*. Von allen DNA-Proben der 29 putativen getesteten Transformanden

konnte ein Produkt des Gens *PMK1* amplifiziert werden. Dies zeigt, dass die extrahierte DNA in allen Fällen als PCR Template geeignet war. Desweiteren konnte bei 7 Klonen ebenfalls ein Produkt des Wildtypallels von *MoHEG16* generiert werden. Die anderen 22 Klone, bei denen kein Produkt erhalten wurde, wurden als $\Delta moheg16$ KO-Mutanten angesehen. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen (P+N) wurde bei den PCRs jeweils DNA des 70-15 Wildtyps oder ein das KO-Konstrukt enthaltendes Plasmid (pJETKOHEG16) verwendet.

Nach Verifizierung des Genotyps wurde eine phänotypische Analyse von jeweils drei unabhängige Klone (Klone 12, 13 und 15, im Folgenden als $\Delta moheg16-1$, $\Delta moheg16-2$ und $\Delta moheg16-3$ bezeichnet) in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt und mit dem *M. oryzae* Isolat 70-15 (Wildtyp) verglichen.

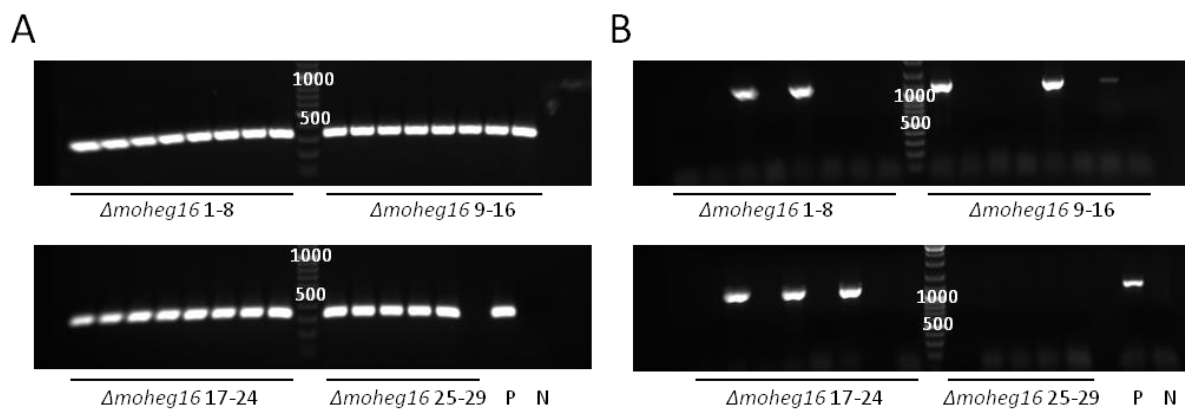


Abbildung 8: PCR zur genotypischen Verifizierung der $\Delta moheg16$ -Mutanten. Nach DNA-Extraktion von 29 putativen Transformanten, wurde jeweils eine PCR auf die *M. oryzae* Isolat 70-15 Wildtypgene *PMK1* (A) und *MoHEG16* (B) durchgeführt. Die erste PCR diente dabei als Kontroll-PCR (Produkt besaß eine Größe von 337 bp), die zweite PCR der Überprüfung des Genotyps (Produkt besaß eine Größe von 1159 bp). Als Positiv- bzw. Negativkontrolle (P bzw. N) wurde jeweils DNA des Wildtypisolats (70-15) bzw. ein das KO-Konstrukt enthaltendes Plasmid (pJETKOHEG16) als Template verwendet. Als Größenmarker wurde der LadderMix der Firma Thermo Scientific verwendet.

3.2.2.2 Phänotypische Analyse der $\Delta moheg16$ KO-Mutanten

Zur Analyse des Phänotyps der genotypisch verifizierten Transformanten, wurden Pflanzen der Gerstensorte Vada jeweils mit Sporen der Transformanten bzw. des korrespondierenden Wildtyps 70-15 mit jeweils 150.000 Sporen/mL inokuliert und der Verlauf der Pathogenese mikroskopisch bzw. die Entwicklung von Rice-Blast-Symptomen makroskopisch ausgewertet.

Der mikroskopische Phänotyp der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde in einem ersten Pathogenitätsassay im kompletten Verlauf der Pathogenese (6, 24 und 72 h p.i.) erfasst. Bei dieser ersten Analyse stellte sich heraus, dass sich die drei getesteten Klone nur zu 72 h p.i. signifikant abweichend zum Wildtyp verhielten (s.u.). Aus diesem Grund wurde in darauf folgenden

Replikaten der mikroskopischen Analyse ausschließlich dieser späte Zeitpunkt der Interaktion ausgewertet.

Für die licht- bzw. fluoreszenzmikroskopischen Auswertung des 72 h p.i.-Zeitpunktes wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen zwischen Pathogen und Wirtzelle in folgende verschiedene Kategorien eingeteilt:

1. App (Appressorium): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert. Fluoreszenz war in dieser Kategorie nicht zu beobachten.
2. Pap (Papille): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert, unter dem eine Zellwandverstärkung (Papille) zu erkennen war. Diese konnte als Penetrationsbarriere für den Pilz dienen und war je nach Ausprägung auch lichtmikroskopisch erkennbar. Unter Auflichtfluoreszenz fluoreszieren Papillen durch die Einlagerung phenolischer Verbindungen und sind dadurch leichter zu erkennen.
3. Fluo (Fluoreszierende Epidermiszelle): Die sich unter einem Appressorium befindliche Epidermiszelle fluoreszierte, was einen Indikator für das Einleiten eines programmierten Zelltod darstellt. Da der Pilz in der frühen Phase des Lebenszyklus auf lebendes Gewebe angewiesen ist, sorgt eine solche so genannte Hypersensitive Reaktion (HR) für das Absterben des Pathogens und wird somit als Abwehrreaktion bewertet.
4. IH (Invasive Hyphen): Die sich unter einem Appressorium befindliche Epidermiszelle fluoreszierte, was einen Indikator für das Einleiten eines programmierten Zelltod darstellt. Da innerhalb der fluoreszierenden Epidermiszelle allerdings invasive Hyphen beobachtet werden konnten, handelt es sich bei dieser Reaktion um einen Zelltod, der durch das Pathogen verursacht wurde.
5. Col (Kollabierte Mesophyllzellen): Die sich unter einem Appressorium befindlichen Mesophyllzellen fluoreszierten und hatten dabei ihre natürliche runde Form verloren, d.h. sie waren kollabiert. Der Pilz konnte demnach das Mesophyll des Blattes kolonisieren, wodurch die Struktur der Zellen nur noch in Form von fluoreszierenden Strichen erkennbar war. Auch in dieser Kategorie waren invasive Hyphen zu erkennen.

Repräsentative Bilder der einzelnen Kategorien sind in Abbildung 9 gezeigt.

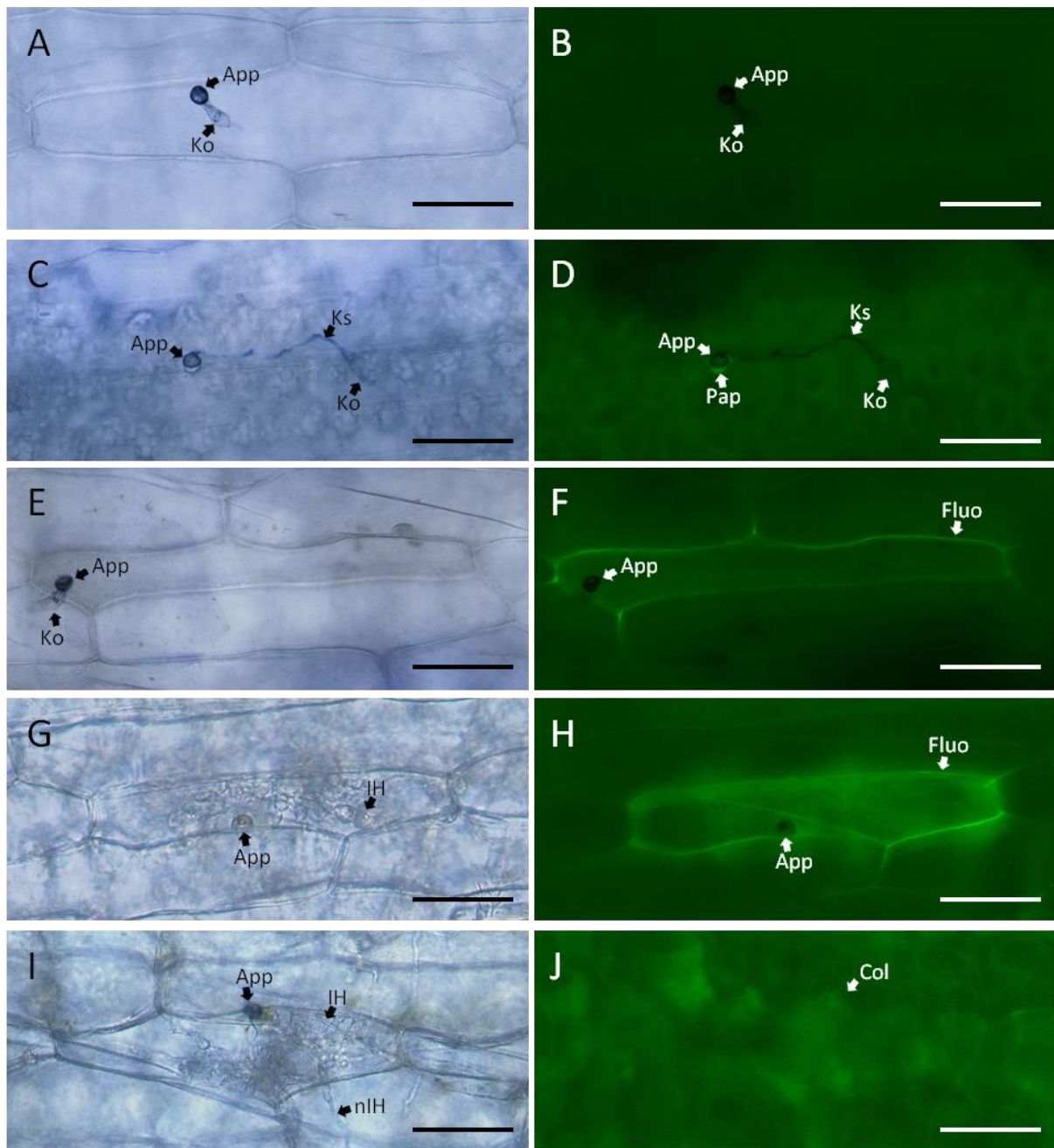


Abbildung 9: Kategorien zur mikroskopischen Auswertung der Interaktion zwischen *M. oryzae* (Isolat 70-15 Wildtyp bzw. $\Delta moheg16$) und der Gerstensorte Vada. Während der Interaktion zwischen *M. oryzae* und der Gerstensorte Vada waren Interaktionsstellen zu 72 h p.i. in typische Kategorien einzuteilen. Dargestellt sind jeweils das licht- und das fluoreszenzmikroskopische Bild (linke Seite [Tinte-Essigsäure gefärbt] bzw. rechte Seite). Unterschieden wurde zwischen einem Appressorium (App), an dem teilweise noch Konidiospore (Ko) und Keimschlauch (Ks) vorhanden waren, unter dem aber keinerlei Fluoreszenz zu beobachten war (A+B); einem Appressorium, unter dem eine punktuelle Fluoreszenz (Papille, Pap) zu beobachten war (C+D); einem Appressorium, unter dem die gesamte Epidermiszelle fluoreszierte (Fluo), in der jedoch keine invasiven Hyphen (IH) erkennbar waren (E+F); einem Appressorium, unter dem die gesamte Epidermiszelle fluoreszierte und in der invasiven Hyphen zu beobachten waren (G+H); und schließlich einem Appressorium, unter dem invasiven Hyphen zu erkennen waren, die sich bereits in die benachbarten Epidermiszellen ausgebreitet hatten (nIH, nekrotrophe invasive Hyphen), unter denen das Mesophyll kollabiert erschien (Col), d.h. keine typische, runde Form mehr aufwies, und fluoreszierte (I+J). Skalierungsbalken repräsentieren jeweils 50 µm.

Der makroskopische Phänotyp wurde ca. 5-6 Tage nach Inokulation fotografisch dokumentiert (Abbildung 10A). Hierbei wurde keine Abweichung im Infektionsbild zwischen Wildtyp und KO-Mutanten festgestellt. Jeder Genotyp war entsprechend in der Lage typische Symptome zu verursachen.

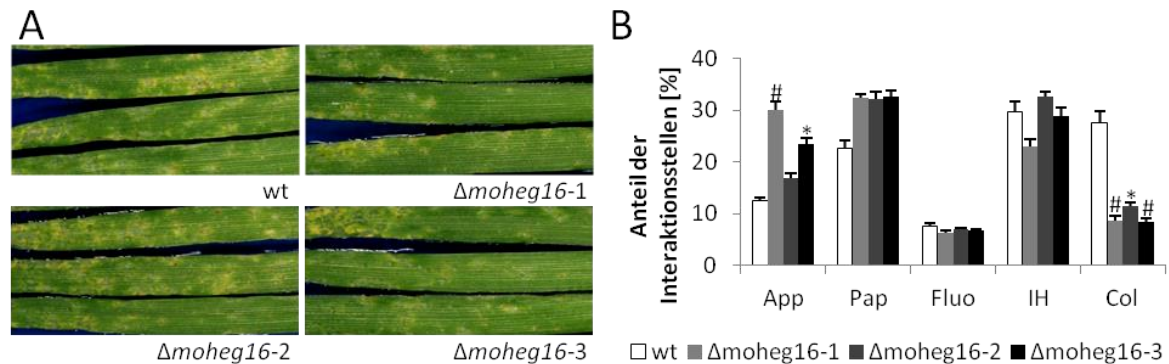


Abbildung 10: Makroskopische und mikroskopische Analyse des Phänotyps von *Δmoheg16* während der Interaktion mit der Gerstensorte Vada. Gerstenpflanzen der Sorte Vada wurden mit Sporen des *M. oryzae* Isolat 70-15 (Wildtyp) bzw. mit Sporen dreier unabhängiger *Δmoheg16*-Mutanten (250.000 Sporen/mL) inokuliert. Nach 96 h p.i. wurde der Infektionsphänotyp makroskopisch bestimmt (A). Für die mikroskopische Analyse wurden zu 72 h p.i. jeweils Primärblätter geerntet und entfärbt. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt. Pro Versuch wurden je 3 Blätter licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen kategorisiert und die Ergebnisse der Einzelversuche zusammengefasst. Angezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler (B). Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * (t-Test, 95 % Vertrauensbereich) oder # (Mann-Whitney-Rangsummentest, 95 % Vertrauensbereich) dargestellt.

Durch die mikroskopische Analyse der Interaktionen von *Δmoheg16*-Mutanten mit der Gerstensorte Vada (graue Balken) bzw. von dem korrespondierenden Wildtyp mit der Gerstensorte Vada (weiße Balken) stellte sich heraus, dass teilweise signifikante Unterschiede zwischen beiden Interaktionen zu beobachten waren. Dies äußerte sich, indem Interaktionsstellen zwischen den Transformanten und Vada häufiger den Kategorien „Appressorium“ und „Papille“ zuzuordnen waren, als Interaktionsstellen zwischen dem Wildtyp und Vada. Das bedeutet weiterhin, dass die Transformanten weniger häufig in die Wirtszellen eindringen konnten, da sie entsprechend häufiger nicht penetrieren konnten oder durch eine Papille gestoppt wurden. Im Fall der Klone 1 und 3 war hier in der Kategorie „Appressorium“ sogar ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp zu verzeichnen. In den Kategorien „Fluoreszierende Epidermizelle“ und „Invasive Hyphen“ konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Transformanten beobachtet werden. In der Kategorie „Kollabiertes Mesophyll“ dagegen unterschieden sich alle drei untersuchten Transformanten signifikant vom Wildtyp indem zu dem untersuchten Zeitpunkt in der Interaktion zwischen dem Wildtyp und Vada signifikant mehr kollabiertes Mesophyll zu beobachten war als in der Interaktion zwischen den drei KO-Mutanten und Vada. D.h. der Wildtyp konnte das Mesophyll der Wirtspflanze schneller kolonisieren als die Mutanten. So

scheint es eine Einschränkung für *M. oryzae* zu sein, wenn der *MoHEG16* Locus und damit *MoHEG16* fehlt, da KO-Mutanten weniger häufig in die Epidermiszellen oder Mesophyllzellen des Wirtes eindringen konnten.

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse aller drei unabhängigen Versuche zu 72 h p.i. zusammengenommen und alle drei Klone im Vergleich zu *M. oryzae* Isolat 70-15 (Wildtyp) mittels t-Test oder Mann-Whitney-Rangsummentest ($p > 0,05$, 95 % Vertrauensbereich) ausgewertet.

3.2.3 Funktionale Analyse von *MoHEG18*

Bei der funktionalen Analyse von *MoHEG18* wurde analog zu der Analyse von *MoHEG16* verfahren (s. 3.2.2). Nach der genotypischen Verifizierung wurden drei unabhängige Klone ausgesucht und in drei unabhängigen biologischen Replikaten der makroskopische und der mikroskopische Phänotyp ermittelt und jeweils mit dem des korrespondierenden Wildtyps (*M. oryzae* Isolat 70-15) verglichen.

3.2.3.1 Genotypische Analyse der $\Delta moheg18$ KO-Mutanten

Die Ergebnisse beider PCRs zur Verifizierung des $\Delta moheg18$ Genotyps sind in Abbildung 8 dargestellt (vgl. 3.2.2.1). Von allen 32 getesteten putativen Transformanden konnte das Produkt der Kontroll-PCR, also mit für das Wildtypgen von *PMK1* spezifischen Primern, amplifiziert werden (Abbildung 11A). Weiterhin konnte das Produkt für das *MoHEG18* Wildtypgen bei vielen getesteten putativen Transformanden generiert werden, nicht jedoch bei fünf Klonen, die daraufhin als positive Transformanden angesehen wurden (Abbildung 11B). Als Positiv- bzw. Negativkontrollen (P+N) wurde bei den PCRs jeweils DNA des 70-15 Wildtyps oder ein das KO-Konstrukt enthaltendes Plasmid (pGem-TeasyKOHEG18) verwendet. Von den fünf putativen Transformanden wurden drei in einer phänotypischen Analyse mit drei unabhängigen biologischen Replikaten untersucht (Klone 12, 21 und 23, im Folgenden als $\Delta moheg18-1$, $\Delta moheg18-2$ und $\Delta moheg18-3$ bezeichnet, s. 3.2.3.2).

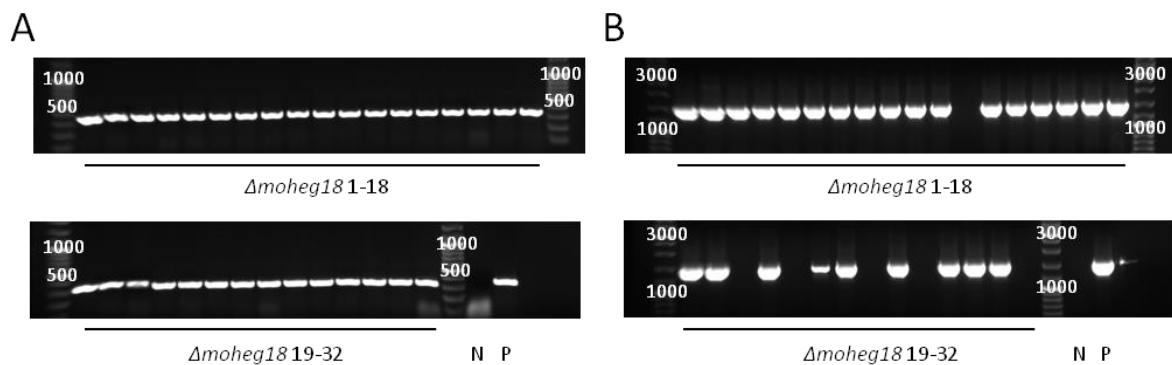


Abbildung 11: PCR zur Verifizierung der *Δmoheg18* KO-Mutanten. Nach DNA-Extraktion von 30 putativen Transformanten, wurde jeweils eine PCR auf die Wildtypgene des *M. oryzae* Isolats 70-15 *PMK1* (A) und *MoHEG18* (B) durchgeführt. Die erste PCR diente dabei als Kontroll-PCR (Produkt besaß eine Größe von 337 bp), die zweite PCR der Überprüfung des Genotyps (Produkt besaß eine Größe von 1470 bp). Als Positiv- bzw. Negativkontrolle (P bzw. N) wurde jeweils DNA des Wildtypisolats (70-15) bzw. ein das KO-Konstrukt enthaltendes Plasmid (pGem-TeasyKOHEG18) als Template verwendet. Als Größenmarker wurde der LadderMix der Firma Thermo Scientific verwendet.

3.2.3.2 Phänotypische Analyse der *Δmoheg18* KO-Mutanten

Analog zu der Vorgehensweise bei den *Δmoheg16* Mutanten wurde zunächst die Gerstensorte Vada mit allen drei unabhängigen *Δmoheg18* Mutanten bzw. dem korrespondierenden Wildtyp inokuliert und die Interaktion in einer ersten Zeitreihe zu mehreren Zeitpunkten nach der Inokulation (6, 24 und 72 h p.i.) licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass zu 6 h p.i. zwei von drei KO-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp am Ende ihrer Keimschläuche weniger Appressorien ausbildeten (nicht gezeigt). Zu den analysierten, späteren Zeitpunkten, 24 und 72 h p.i. waren wiederum keine signifikanten Unterschiede mehr zu beobachten. Aus diesem Grund wurden bei der Analyse der *Δmoheg18* Mutanten in den folgenden beiden unabhängigen biologischen Replikaten die frühe Interaktionsphase (4-6 h p.i.) berücksichtigt.

Bei der ausschließlich lichtmikroskopischen Auswertung dieser Zeitpunkte wurden die Interaktionsstellen zwischen Pathogen und Wirtszelle in folgende verschiedene Kategorien eingeteilt (Abbildung 12):

1. oKS (ohne Keim Schlauch): Spore war nicht ausgekeimt.
2. KS (Keim Schlauch): Spore war mit Keim Schlauch ausgekeimt.
3. imApp (unreifes Appressorium): Ein Appressorium begann sich am Ende des Keim-schlauches auszudifferenzieren, es war noch nicht melanisiert.
4. App (Appressorium): Ein melanisiertes Appressorium hatte sich ausdifferenziert.

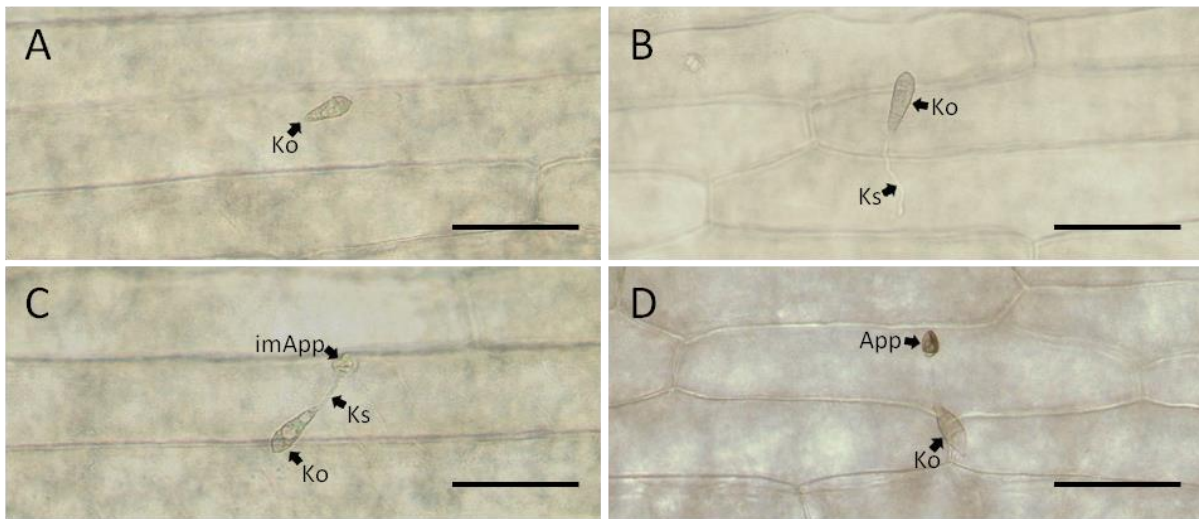


Abbildung 12: Kategorien zur lichtmikroskopischen Auswertung der Interaktion zwischen *M. oryzae* (Isolat 70-15 Wildtyp bzw. $\Delta moheg18$) und der Gerstensorte Vada. Während der Interaktion zwischen *M. oryzae* und der Gerstensorte Vada waren zu 4-6 h p.i. Interaktionsstellen in typische Kategorien einzuteilen. Unterschieden wurde zwischen einer noch nicht ausgekeimten Konidiospore (Ko)(A), einer Konidiospore mit Keimschlauch (Ks)(B), einer Konidiospore mit Keimschlauch und noch unreifem, nicht melanisiertem Appressorium (imApp) (C) und einer Konidiospore mit Keimschlauch und reifem, melanisiertem Appressorium (App) (D). Skalierungsbalken repräsentieren jeweils 50 μm .

Auf makroskopischer Ebene ließ sich, ähnlich dem makroskopischen Eindruck der $\Delta moheg16$ Mutanten (3.2.2.2), keine Abweichung zwischen dem von Mutanten oder korrespondierendem Wildtyp (*M. oryzae* Isolat 70-15) verursachten Infektionsbild bemerken (s. Abbildung 13A).

Nach insgesamt drei mikroskopischen Analysen der frühen Interaktionsphase (4-6 h p.i.) zwischen $\Delta moheg18$ Mutanten bzw. korrespondierendem Wildtyp der Gerstensorte Vada, konnte lediglich die Tendenz eines Phänotyps der $\Delta moheg18$ Mutanten mit verspäteter Appressorienbildung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Wurden die Ergebnisse aller drei Replikate zusammengefasst und prozentuale Anteile der Interaktionsstellen zwischen den KO-Mutanten und Vada mit denen zwischen Wildtyp und Vada verglichen (s. Abbildung 13B), zeigte sich keine signifikante Veränderung des Phänotyps mittels t-Test oder Mann-Whitney-Rangsummentest ($p > 0,05$, 95 % Vertrauensbereich). Der zu beobachtende Phänotyp zweier $\Delta moheg18$ Mutanten im ersten Replikat schien demnach durch andere, möglicherweise experimentell bedingte, Faktoren begünstigt. Die Kausalität zwischen Genotyp und Phänotyp der $\Delta moheg18$ Mutanten im Vergleich zum Wildtyp kann hier demnach nicht durch eine statistische Signifikanz gestärkt werden. Es konnte lediglich eine Tendenz beobachtet werden, deren Effekt durch zeitlich bedingte Entwicklung des Pilzes ausgeglichen werden konnte, da auch im ersten Replikat zu den analysierten späteren Zeitpunkten eine signifikanten Unterschiede zwischen $\Delta moheg18$ Mutanten und korrespondierendem Wildtyp beobachtet werden konnten.

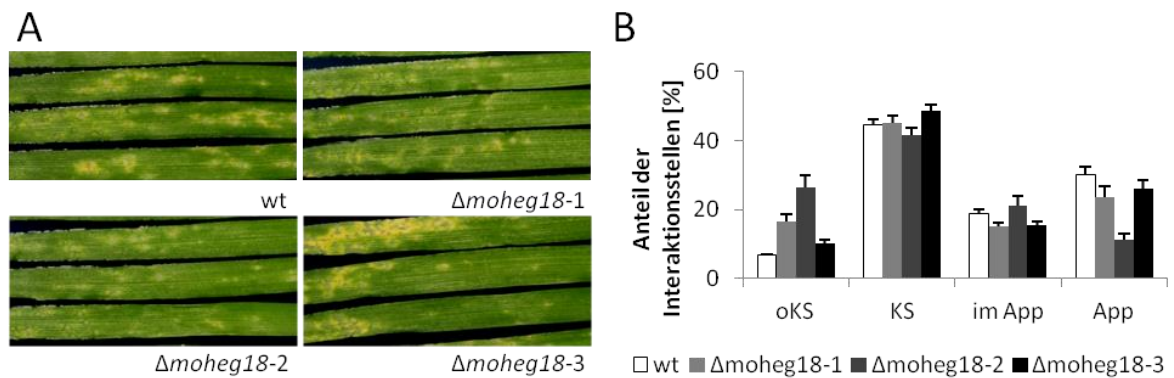


Abbildung 13: Makroskopische und mikroskopische Analyse des Phänotyps von $\Delta moheg18$ während der Interaktion mit der Gerstensorte Vada. Gerstenpflanzen der Sorte Vada wurden mit Sporen des *M. oryzae* Isolat 70-15 (Wildtyp) bzw. mit Sporen dreier unabhängiger $\Delta moheg18$ -Mutanten (250.000 Sporen/mL) inokuliert. Nach 96 h p.i. wurde der Infektionsphänotyp makroskopisch bestimmt (A). Für die mikroskopische Analyse wurden zu 4-6 h p.i. jeweils Primärblätter geerntet und entfärbt. Dieser Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt. Pro Versuch wurden je 3 Blätter licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen kategorisiert und die Ergebnisse der Einzelversuche zusammengefasst. Angezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler (B). Statistisch signifikante Unterschiede waren durch t-Test (95 % Vertrauensbereich) oder Mann-Whitney-Rangsummentest (95 % Vertrauensbereich) nicht zu ermitteln (s.Text).

3.3 Der Einfluss von MoHEGs auf MoNLP vermittelten Zelltod

Die direkte funktionale Analyse von Effektorgenen bei filamentösen Pilzen stellt immer noch eine besondere Herausforderung dar. Dies ist insbesondere der Fall, wenn Funktionen verschiedener Effektoren innerhalb eines Effektorrepertoires redundant sind (s. 1.4.1) und die oftmals hohe Anzahl an Kandidatengenen die genaue funktionale Analyse sehr zeitaufwändig macht.

Hinweise auf Funktionen von Effektorkandidaten können so genannte Zelltodassays geben (Wang et al., 2011; Kleemann et al., 2012). Diese werden transient in den Modellpflanzen *N. benthamiana* oder *A. thaliana* durchgeführt. Hierbei wird durch transiente Überexpression des zu untersuchenden Effektorgens in *N. benthamiana* bestimmt, ob der Effektor selbst eine Nekrose induzierende Wirkung besitzt. Entsprechend wurde eine putative Zelltod induzierende Wirkung für die Späten MoHEGs untersucht. Eine solche Funktion eines MoHEGs könnte für die Einleitung oder Aufrechterhaltung der nekrotrophen Phase des Lebenszyklus von *M. oryzae* wichtig sein.

Zusätzlich kann durch Co-Überexpression eines zu analysierende Effektorgens und eines bekannten Zelltodinduktorgens, der Einfluss des Effektors auf das durch den Zelltodinduktor induzierte Zelltodprogramm untersucht werden. Dadurch wird der Frage nachgegangen, ob der Effektor eine supprimierende Wirkung auf das spezifisch induzierte Zelltodprogramm besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend der Einfluss der MoHEGs auf den durch *Magnaporthe*-spezifische Zelltodinduktoren verursachten Zelltod in *N. benthamiana* analysiert. Eine solche Funktion eines MoHEGs könnte der Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktionsphase im Lebenszyklus von *M. oryzae* dienen.

Für die Etablierung eines solchen Zelltodassays, mussten zunächst *Magnaporthe*-spezifische Zelltodinduktoren identifiziert, d.h. ihre Funktion als solche, untersucht werden.

3.3.1 Untersuchung von *Magnaporthe*-spezifischen Zelltodinduktoren

NLPs (engl. Nep1 [Necrosis- and Ethylene-inducing Protein1]-Like Proteins) induzieren einen spezifischen Zelltod in zweikeimblättrigen Pflanzen (Bailey, 1995). In einer Studie von Kleemann et al. (2012) wurden NLPs bereits erfolgreich in einem Zelltodassay genutzt und ein Effektor mit Zelltod supprimierender Wirkung aus *C. higginsianum* identifiziert (ChEC3, Effektorkandidat 3 aus *C. higginsianum*, engl. *C. higginsianum* effector candidate 3). Auch *M. oryzae* besitzt vier *NLP* Gene (Gijzen and Nürnberger, 2006). Aus diesem Grund schien auch die Verwendung der MoNLPs in einem entsprechenden Zelltodassay für MoHEGs interessant. Ob MoN-

LPs eine cytotoxische Wirkung in *N. benthamiana* zeigen, war noch nicht bekannt und musste vor der Etablierung des Zelltodassays untersucht werden.

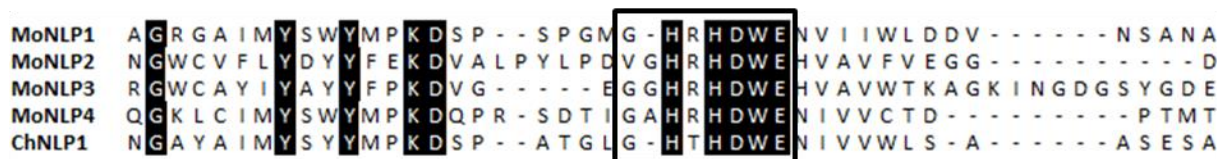


Abbildung 14: Proteinsequenzen der MoNLPs und ChNLP. Dargestellt ist ein Alignment der Proteinsequenzen der MoNLPs und ChNLP1 im Bereich des für NLPs charakteristischen Heptapeptidmotiv. Allen Sequenzen gemeinsame Aminosäuren sind schwarz hinterlegt. Angewendet wurde ein ClustalW Alignment mit dem Programm BioEdit.

In Abbildung 14 sind die Sequenzen der vier verschiedenen *M. oryzae* NLPs (MoNLPs) im Bereich des in NLPs stark konservierten Heptapeptidmotivs GHRHDWE dargestellt. Das Heptapeptid ist Teil der NPP1 (engl. Necrosis-inducing *Phytophthora* Protein 1) Domäne (Pfam PF05630) (Fellbrich et al., 2002), welche Mitglieder der NLP Familie kennzeichnet und für die biolog. Aktivität von NLPs erforderlich ist (Ottmann et al., 2009). MoNLP1 wurde hier dem *Magnaporthe* Gen MGG_08454 zugeordnet, MoNLP4 entsprechend MGG_10532, MoNLP2 entsprechend MGG_00401 und MoNLP3 entsprechend MGG_02332. MoNLP1 und MoNLP4 werden den so genannten Typ1 NLPs zugeordnet, MoNLP2 und MoNLP3 dagegen den Typ2 NLPs (Gijzen and Nürnberger, 2006). Typ1 und Typ2 NLPs unterscheiden sich in der Anzahl an Cysteinresten innerhalb der NPP1 Domäne. Zusätzlich ist das ChNLP1 aus *Colletotrichum higginsianum* aufgeführt, das bereits im Zusammenhang mit einem ähnlichen Zelltodassay beschrieben wurde (Kleemann et al., 2012). Aus diesem Grund wurde es für die Ermittlung der Zelltod induzierenden Wirkung der MoNLPs als Positivkontrolle für Zelltodinduktion verwendet (siehe 3.3.1.1). Alle aufgeführten NLPs besitzen zudem ein Signalpeptid, was auf eine extrazelluläre Funktion hindeutet (nicht gezeigt).

3.3.1.1 Untersuchung der Zelltod induzierenden Wirkung der MoNLPs

Zur Ermittlung der Zelltod induzierenden Wirkung der MoNLPs wurde ein transientes Expressionssystem in *N. benthamiana* verwendet. Genauer gesagt handelte es sich hierbei um *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte transiente Transformation (ATMT, engl. *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated transient Transformation), bei der die *A. tumefaciens* (*A.t.*) Lösung in die Unterseite der *N. benthamiana* Blätter infiltriert wurde. Als Kontrollen wurde Konstrukte, die für ChNLP1 oder YFP (engl. Yellow Fluorescent Protein) kodierten, verwendet. Da ChNLP1 Zelltod in *N. benthamiana* induziert, diente es hier als Positivkontrollen für Zelltodinduktion und da für YFP keine Zelltod induzierende Wirkung bekannt ist, diente es hier als Negativkontrolle für Zell-

todinduktion. Zellen von *A. tumefaciens*, welche Konstrukte für die Expression der Kontrollproteine enthielten, wurden jeweils in die eine Blatthälfte, entsprechende Zellen mit Konstrukten für das zu untersuchende MoNLP, in die andere Blatthälfte infiltriert (siehe Abbildung 15A).

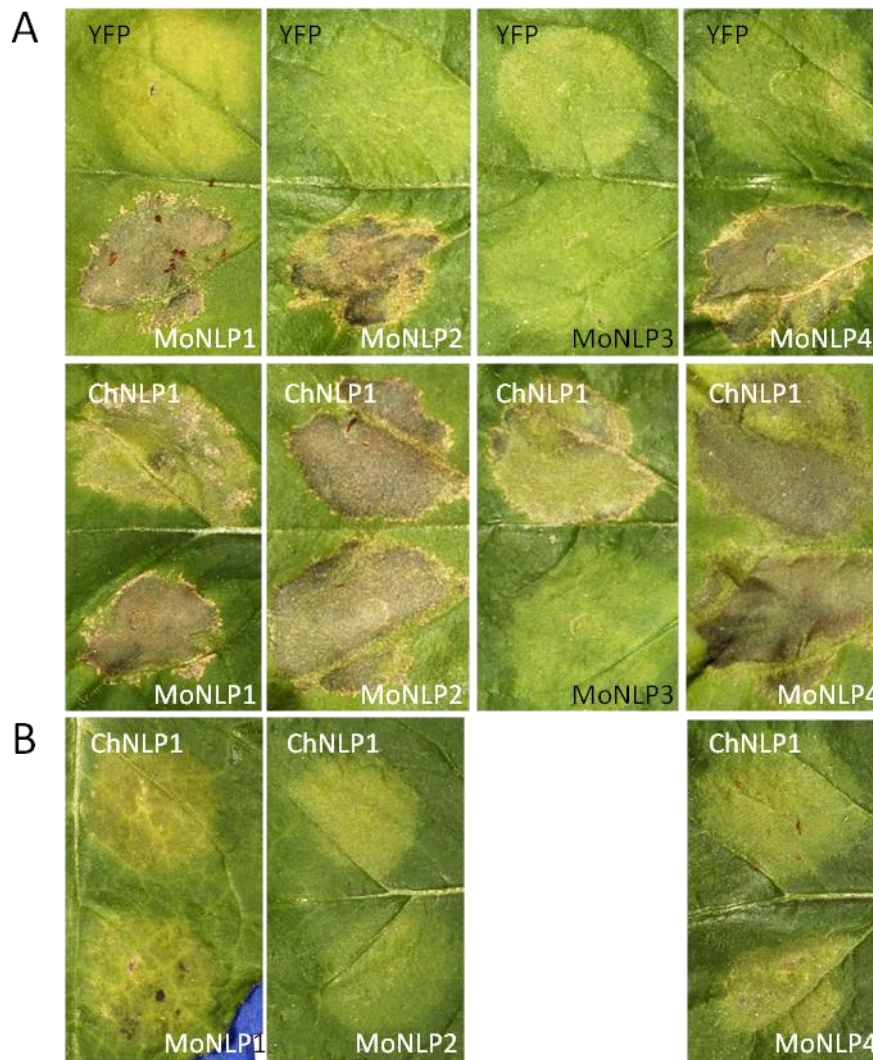


Abbildung 15: Analyse der Zelltod induzierenden Wirkung der MoNLPs durch *Agrobacterium tumefaciens* (*A.t.*) vermittelte transiente Transformation. *A.t.* Hauptkulturen wurden mit einer OD von 0,5 in die Blattunterseite 5-6 Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert und die Nekroseninduktion nach 6 Tagen ausgewertet. *A.t.* Kulturen trugen jeweils ein Konstrukt, das für ein MoNLP, ein Kontrollprotein oder ChEC3 kodierte. Als Kontrollproteine fungierten YFP (Protein ohne Zelltod induzierende Wirkung, Negativkontrolle) oder ChNLP1 (NLP mit Zelltod induzierender Wirkung aus *C. higginsianum*, Positivkontrolle). Das Effektorprotein ChEC3 supprimiert ChNLP vermittelten Zelltod, weshalb eine Co-Infiltration der *A.t.* Kulturen mit Konstrukten für ChNLP oder ChEC3, eine Kontrolle für Zelltodunterdrückung (Positivkontrolle) darstellte. *A.t.* Kulturen, die Konstrukte für MoNLP oder ein Kontrollprotein trugen wurden jeweils einzeln (A) oder zu gleichen Teilen mit der *A.t.* Kultur, die das Konstrukt für ChEC3 trug, gemischt (B). Ein positives Ergebnis des Tests (Zelltodinduktion oder Zelltodunterdrückung) ist mit weißer Schrift, ein negatives Ergebnis (keine Zelltodinduktion oder keine Zelltodunterdrückung) mit schwarzer Schrift gekennzeichnet.

Die Bildung von Nekrosen wurde nach 6 Tagen ausgewertet und äußerte sich durch braunes, trocken und brüchig gewordenes Blattmaterial. Eine Zelltod induzierende Wirkung konnte für

MoNLP1, MoNLP4 und MoNLP2 ermittelt werden, für MoNLP3 im Gegensatz dazu keine. In der Abbildung wird die Induktion einer Nekrose durch weiße Schrift, keine Nekroseinduktion mit schwarzer Schrift hervorgehoben.

Nachdem drei Zelltod induzierende MoNLPs ermittelt werden konnten, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob dieser Zelltod sich durch ChEC3 (*C. higginsianum* effector candidate 3) unterdrücken ließ. Bei ChEC3 handelt es sich um einen Effektor aus *C. higginsianum*, einem ebenfalls hemibiotrophen Ascomyceten, der in der Lage ist NLP vermittelten Zelltod zu supprimieren (Kleemann et al., 2012). Hier sollte entsprechend ermittelt werden, ob das induzierte Zelltodprogramm der MoNLPs ähnlich dem des ChNLP1 einzuschätzen war. *A. t.* Kulturen mit Konstrukten für jeweils ChNLP1 und ChEC3 wurden in die eine Blatthälfte und *A. t.* Kulturen mit Konstrukten für jeweils MoNLP und ChEC3 in die andere Blatthälfte co-infiltriert (s. Abbildung 15B). Die Co-Infiltration von ChNLP1 und ChEC3 diente dabei als Positivkontrolle für Unterdrückung von NLP vermitteltem Zelltod. Das Ergebnis des Experiments zeigte, dass die Wirkung aller in *N. benthamiana* Nekrose induzierenden NLPs durch ChEC3 supprimiert werden konnte. Beim Effekt der Zelltodunterdrückung wurde dies in der Abbildung mit weißer Schrift hervorgehoben.

3.3.1.2 Expression von MoNLPs während der Wirtinteraktion mit Gerste

Um der Frage nachzugehen, ob MoNLPs in die Pathogenese von *M. oryzae* funktional involviert sein könnten, wurde ihre Expression während der Pathogen-Wirt-Interaktion mit Gerste untersucht. Da MoNLP1 unter den 157 Effektorkandidaten (Rhoda Delventhal, Dissertation, 2015) gefunden werden konnte (s. 3.1.1), gab es bereits Hinweise auf die Induktion dieses MoNLPs während der Wirtinteraktion.

Für die Expressionsanalyse wurde eine RT-qPCR Analyse mit cDNA aus mit *M. oryzae* inokulierten Epidermisproben durchgeführt (Abbildung 16). Die Expressionsanalyse ist relativ zu dem konstitutiv exprimierten *Magnaporthe* α Tubulin dargestellt. Es wurde ermittelt, dass ausschließlich die Typ1 NLPs (MoNLP1 und MoNLP4) während der *M. oryzae*-Gerste-Interaktion exprimiert werden. Dabei ist ein Expressionsmaximum zu 48 h p.i. zu beobachten, wenn der Pilz sich von der primär infizierten Zelle ausgehend weiter ausbreitet und die erste kolonisierte Zelle abstirbt. Ein zweiter Expressionspeak ist zu 96 h p.i. zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist die nekrotrophe Phase des *M. oryzae* Lebenszyklus eingeleitet, d.h. das Pathogen tötet die Wirtszellen ab und es bilden sich Symptome mit neuen Konidien aus.

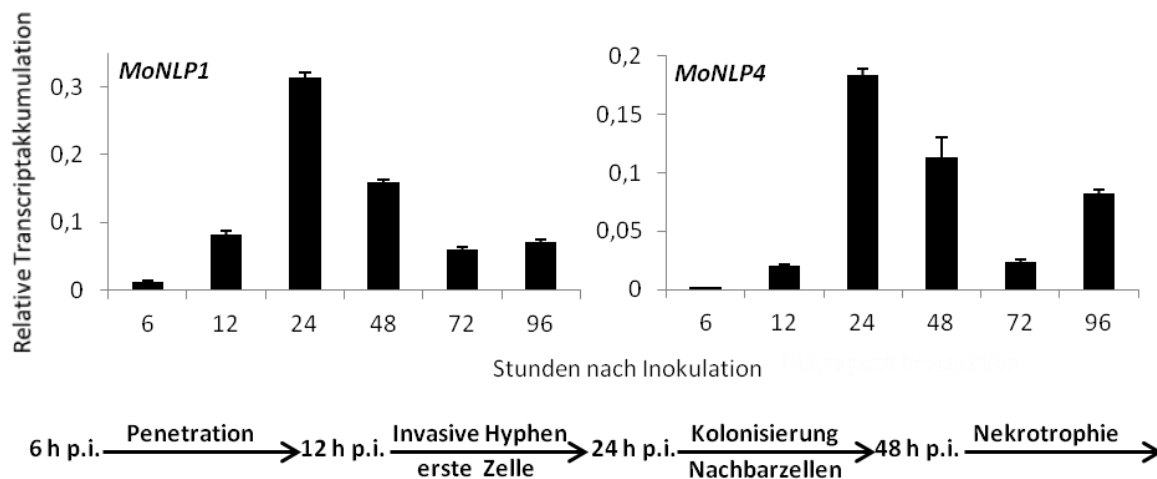


Abbildung 16: Expressionsprofile von MoNLP1 und MoNLP4. Gerstenpflanzen der Sorte Ingrid wurden mit dem *M. oryzae* Wirtisolat TH6772 inokuliert (750.000 Sporen/mL) und die Epidermis von ca. 10-20 Primärblättern nach 0, 6, 12, 24, 48, 72 und 96 h p.i. geerntet. Die Pilzentwicklung ist im zeitlichen Verlauf durch einen Zeitstrahl angedeutet. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden die Transkriptabundanz von MoNLP1 und MoNLP4 relativ zu dem konstitutiven exprimierten Gen *αTubulin* mit Hilfe gen-spezifischer Primer durch RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate. Transkriptabundanzanalysen zu den MoNLPs wurden in einem unabhängigen biologischen Replikate mit einer kürzeren Zeitreihe (6-48 h p.i.) mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

3.3.2 Zelltodassay mit MoHEGs

Nachdem eine Zelltod induzierende Wirkung für MoNLP1, MoNLP2 und MoNLP4 in *N. benthamiana* ermittelt wurde und somit *Magnaporthe*-spezifische Zelltodinduktoren identifiziert werden konnten, sollten MoHEGs in einem Zelltodassay in *N. benthamiana* auf eine diesen Zelltod suppressierende Wirkung untersucht werden. Dies würde auf einen ähnlichen Wirkmechanismus wie den von ChEC3 hindeuten.

Darüber hinaus sollte eine Zelltod induzierende Wirkung der Späten MoHEGs untersucht werden. Die Studien zu einer putativen Zelltod induzierenden oder unterdrückenden Wirkung von Späten MoHEGs wurden im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit (Philipp M. Bertram, 2014) durchgeführt.

3.3.2.1 Zelltod unterdrückende Wirkung von Frühen MoHEGs

Auf Grund ihres Expressionsmaximums in der frühen Phase des Lebenszyklus von *M. oryzae*, wurde eine putative Rolle der Frühen MoHEGs in Zusammenhang mit der Etablierung oder Aufrechterhaltung dieser biotrophen Phase untersucht. Da das Pathogen in dieser Phase auf lebendes Wirtsgewebe angewiesen ist, wurden die Frühen MoHEGs im ersten Teil des Zelltodassays auf die Fähigkeit hin untersucht Zelltod, hier den MoNLP1 vermittelten Zelltod, zu suppressieren.

Eine potenzielle Zelltod induzierende Wirkung wurde für die Frühen MoHEGs entsprechend nicht untersucht.

Für die Untersuchung einer Zelltod unterdrückenden Wirkung der Frühen MoNLPs wurden *A. tumefaciens* (*A. t.*) Kulturen mit Konstrukten für MoNLP1 und jeweils MoHEG5, MoHEG7, MoHEG16 oder MoHEG18 zu gleichen Teilen gemischt und in eine Blatthälfte co-infiltriert. Zusätzlich wurden jeweils Kulturen mit Konstrukten für eine Negativ- oder eine Positivkontrolle, d.h. MoNLP1 + YFP für keine Zelltodunterdrückung oder MoNLP1 + ChEC3 für Zelltodunterdrückung (s. 3.3.1.1), in die andere Blatthälfte co-infiltriert. Durch diese gleichzeitige Expression von einer Kontrolle und einer Probe, sollten physiologische Unterschiede zwischen einzelnen Blättern berücksichtigt werden. Beispielhaft sind hier die Ergebnisse für MoHEG5 und MoHEG7 gezeigt (Abbildung 17). Für die anderen Frühen MoHEGs wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (nicht gezeigt). Es konnte in keinem Fall eine Zelltod unterdrückende Wirkung, ähnlich ChEC3, für die untersuchten Frühen MoHEGs festgestellt werden.

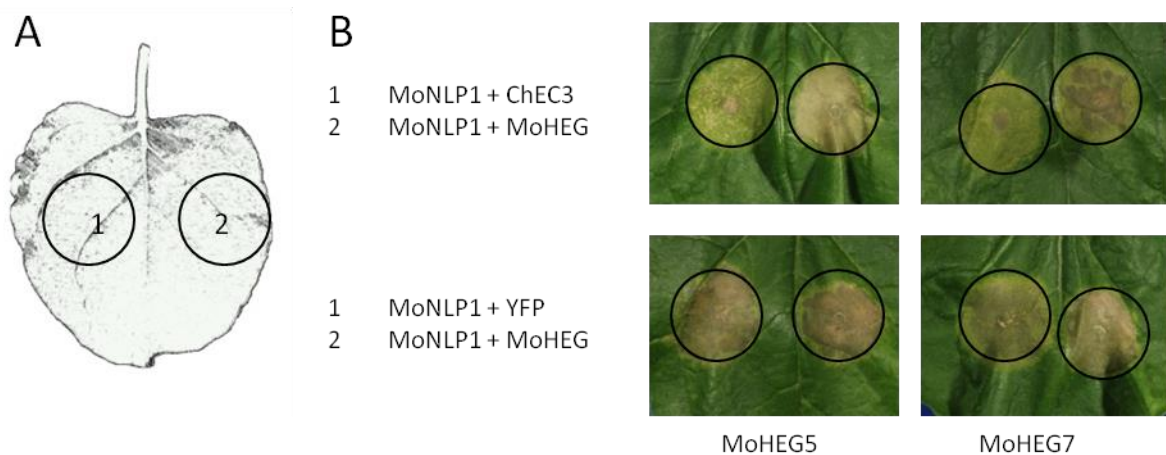


Abbildung 17: Zelltod unterdrückende Wirkung Früher MoHEGs. *A. t.* Hauptkulturen wurden auf eine OD von 0,5 eingestellt und in die Blattunterseite 5-6 Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. *A. t.* Kulturen, die das Konstrukt für MoNLP1 trugen, wurden dabei zu gleichen Teilen mit *A. t.* Kulturen, die das Konstrukt für ChEC3, YFP oder ein Frühes MoHEG trugen, gemischt. Als Kontrollen fungierten hier entsprechend die Co-Infiltration von MoNLP1 und ChEC3 (Zelltodunterdrückung, Positivkontrolle) oder die Co-Infiltration von MoNLP1 und YFP (keine Zelltodunterdrückung, Negativkontrolle). (A) zeigt das Infiltrationsschema. (B) zeigt die Auswertung von MoHEG5 und MoHEG7 (exemplarisch dargestellt) nach 6 Tagen.

3.3.2.2 Zelltod induzierende Wirkung von Späten MoHEGs

Zusätzlich zu den Frühen MoHEGs wurden 13 Späte MoHEGs in dem gleichen transienten Zelltodassay auf ihre Fähigkeit hin untersucht den MoNLP vermittelten Zelltods in *N. benthamiana* zu unterdrücken (Bertram, Bachelorarbeit, 2014). Zusätzlich sollte eine Zelltod induzierende Wirkung der Späten MoHEGs ihrerseits ermittelt werden, da auf Grund des Expressionsmaxi-

mums in der späteren biotrophen Interaktionsphase, unmittelbar vor dem Übergang zur nekrotrophen Phase, eine Rolle in Zusammenhang mit Zelltodinduktion in Betracht gezogen wurde.

Für die Untersuchung einer putativen Zelltod induzierende Wirkung der Späten MoHEGs wurden *A. t.* Kulturen mit Konstrukten, die für MoHEGs kodieren, in die Unterseite von *N. benthamiana* Blättern infiltriert. Um physiologische Unterschiede zwischen einzelnen Blättern zu berücksichtigen, wurden jeweils Kulturen mit Konstrukten für eine Positiv- und eine Negativkontrolle für Zelltodinduktion in die eine Blatthälfte und Kulturen mit Konstrukten für die MoHEGs in die andere Blatthälfte infiltriert (s. Abbildung 18A). Als Positivkontrolle für Zelltodinduktion wurde die transiente Expression von MoNLP1 verwendet, als Negativkontrolle die entsprechende von YFP. Es wurden ausschließlich Blätter ausgewertet, auf denen sowohl Positiv- als auch Negativkontrolle das erwartete Ergebnis erzielten (s. Abbildung 18B).

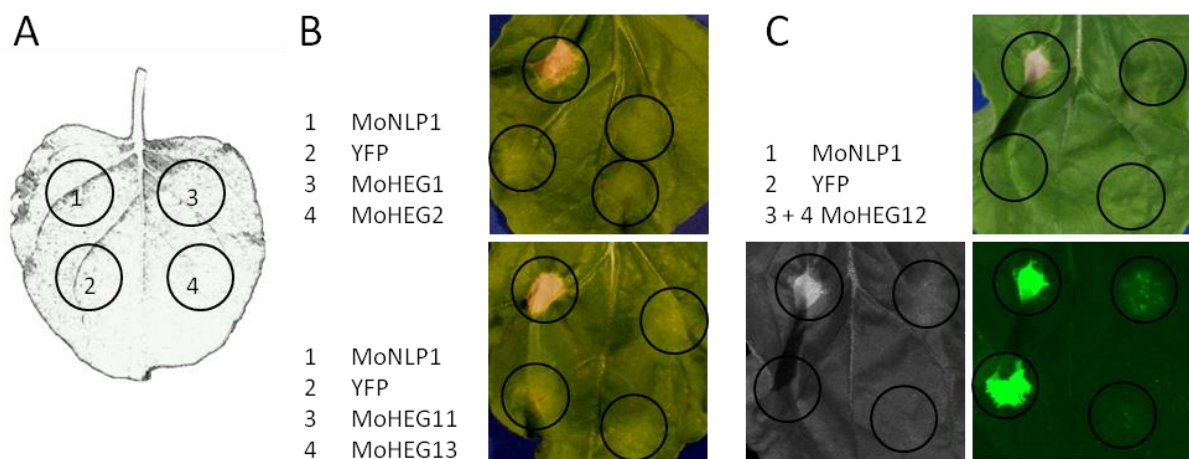


Abbildung 18: Zelltod induzierende Wirkung Später MoHEGs. *A. t.* Hauptkulturen wurden auf eine OD von 0,5 eingestellt und in die Blattunterseite 5-6 Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. *A. t.* Kulturen trugen jeweils ein Konstrukt für MoNLP1, YFP oder ein Spätes MoHEG, wobei YFP als Negativkontrolle (Protein ohne Zelltod induzierende Wirkung) und MoNLP1 als Positivkontrolle (NLP mit Zelltod induzierender Wirkung) fungierten. *A. t.* Kulturen wurden jeweils einzeln infiltriert (A) und die Nekroseinduktion nach 6 Tagen ausgewertet (B). Infiltrationsstellen wurden makroskopisch, als schwarz-weiß Fotografie und UV-Licht ausgewertet (C), wobei bei Letzterem Nekroseinduktion und YFP-Expression sichtbar wurden. Ergebnisse von MoHEG1, MoHEG2, MoHEG11, MoHEG13 und MoHEG12 sind exemplarisch dargestellt. Daten und Fotos stammen aus der Bachelorarbeit von P.M. Bertram (2014).

Die Infiltrationsstellen wurden, zusätzlich zur Auswertung mit bloßem Auge, unter UV-Licht begutachtet, da nekrotische Läsionen Autofluoreszenz zeigen. Dies stellte eine zusätzliche und sensible Kontrolle für Zelltodinduktion bei der Auswertung dar. Darüber hinaus war auch die Fluoreszenz von YFP zu erkennen, was darauf hindeutete, dass das transiente Expressionssystem funktionierte (s. Abbildung 18C). Unter Berücksichtigung beider Auswertungsmethoden stellte sich heraus, dass keines der untersuchten MoHEGs eine Zelltod induzierende Wirkung besaß.

3.3.2.3 Zelltodunterdrückende Wirkung von Späten MoHEGs

Nachdem keine Zelltod induzierende Wirkung für die Späten MoHEGs selbst festgestellt werden konnte, wurde im zweiten Teil des Zelltodassays die Fähigkeit der MoHEGs untersucht, MoNLP vermittelten Zelltod zu supprimieren (Bertram, Bachelorarbeit, 2014). Dabei wurden *A. t.* Kulturen mit Konstrukten für jeweils MoNLP1 und den MoHEGs zu gleichen Teilen gemischt und co-infiltriert. Auch hier wurden Positiv- und Negativkontrollen zusätzlich in jedes Blatt infiltriert und nur solche Blätter ausgewertet, bei denen die Kontrollen das erwartete Ergebnis zeigten (Abbildung 19A). Beispielhaft sind hier die Ergebnisse für MoHEG2 und MoHEG14 gezeigt. Auch hier dienten als Positivkontrolle für erfolgreiche Zelltodunterdrückung die Co-Infiltration von *A. t.* Kulturen mit Konstrukten für MoNLP1 und ChEC3 (s. 3.3.1.1). Als Negativkontrolle für keine Zelltodunterdrückung diente die transiente Co-Expression von MoNLP1 und YFP, da für YFP keine Zelltod unterdrückende Wirkung bekannt ist.

Bei der Auswertung des Assays stellte sich heraus, dass Infiltrationsstellen nicht in allen Fällen eindeutig als Nekroseinduktion oder -unterdrückung gewertet werden konnten. Aus diesem Grund wurde hier eine quantitative Auswertung gewählt, bei der die Zuordnung der Infiltrationsstellen zu beiden Kategorien (Nekroseinduktion oder -unterdrückung) berücksichtigt wurde. Diese Verteilung wurde schließlich prozentual aufgetragen (Abbildung 19B). Dabei wurden ausschließlich Blätter ausgewertet, bei denen Positiv- sowie Negativkontrolle eindeutig das erwartete Ergebnis aufwies. Die absolute Anzahl ausgewerteter Infiltrationsstellen unterschied sich zwischen den einzelnen MoHEGs (Abbildung 19B, Zahlen innerhalb der Balken), da diese entsprechend von einem eindeutigen Ergebnis von Positiv- und Negativkontrolle innerhalb eines Versuchsansatzes abhängig waren. War der Anteil an auswertbaren Infiltrationsstellen innerhalb eines Versuchsansatzes niedrig, wurden zusätzliche Replikate durchgeführt, um die absolute Anzahl der Infiltrationsstellen zu erhöhen und so das Ergebnis zu festigen. Schwankungen im Anteil nicht auswertbarer Blätter, also solcher, bei denen die Kontrollen nicht passend ausgewertet werden konnten, wurden neben physiologischen Unterschieden, auch auf Unterschiede im transienten Expressionslevel zwischen den Versuchspflanzen zurückgeführt.

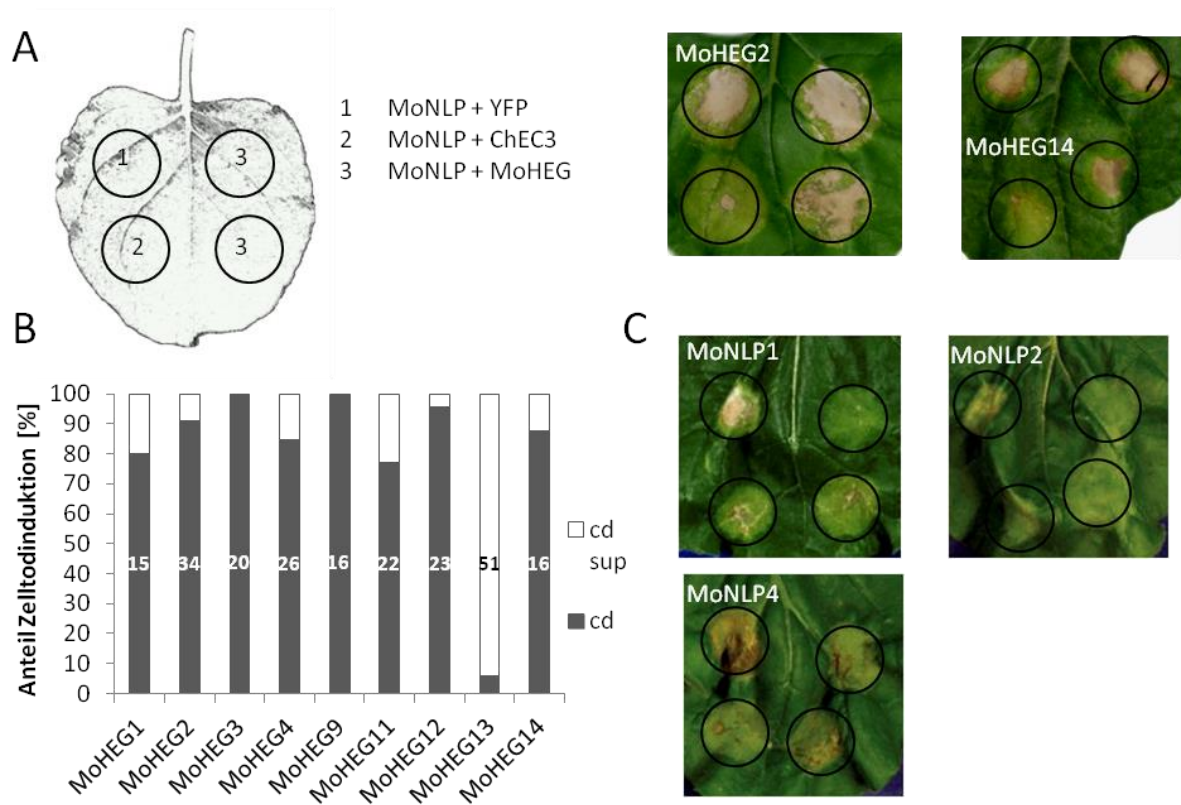


Abbildung 19: Zelltod unterdrückende Wirkung Später MoHEGs. *A.t.* Hauptkulturen wurden auf eine OD von 0,5 eingestellt und in die Blattunterseite 5-6 Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. *A.t.* Kulturen, die das Konstrukt für MoNLP1 trugen, wurden dabei zu gleichen Teilen mit *A.t.* Kulturen, die das Konstrukt für ChEC3, YFP oder ein Spätes MoHEG trugen, gemischt. Als Kontrollen fungierten hier entsprechend die Co-Infiltration von MoNLP1 und ChEC3 (Zelltodunterdrückung, Positivkontrolle) oder die Co-Infiltration von MoNLP1 und YFP (keine Zelltodunterdrückung, Negativkontrolle). Die Nekroseinduktion wurde nach 6 Tagen ausgewertet. (A) Ergebnisse von MoHEG2 und MoHEG14 sind hier exemplarisch dargestellt. (B) Quantifizierung aller Infiltrationsstellen [%] der Zelltodunterdrückung bzw. der Zelltodinduktion aller getesteten Späten MoHEGs, wobei die Anzahl der ausgewerteten Infiltrationsstellen jeweils angegeben ist. Weiße Säule zeigt den Anteil an Zelltodunterdrückung (cd sup), graue Säule den Anteil an Zelltodinduktion an (cd). (C) Das den MoNLP1 vermittelten Zelltod unterdrückende MoHEG13 wurde zusätzlich auf seine Fähigkeit hin untersucht den MoNLP2 und den MoNLP4 vermittelten Zelltod zu unterdrücken (Infiltrationsschema wie unter (A) angegeben). Daten und Fotos stammen aus der Bachelorarbeit von P.M. Bertram (2014).

Es stellte sich schließlich heraus, dass MoHEG13 als einziges Spätes MoHEG in über 90 % der Fälle in der Lage war, MoNLP1 vermittelten Zelltod zu unterdrücken (Abbildung 19B). Aus diesem Grund wurde MoHEG13 zusätzlich zur transienten Co-Expression mit MoNLP1, mit MoNLP2 und MoNLP4 zusammen infiltriert. So konnte gezeigt werden, dass MoHEG13, zusätzlich zu dem MoNLP1 vermittelten Zelltod, auch den MoNLP2 und MoNLP4 vermittelten Zelltod unterdrückte (Abbildung 19C).

3.4 Untersuchung von *MoHEG*-Orthologen in *M. grisea*

Orthologe Gene, die für putative Effektoren kodieren, können sich zwischen einzelnen Arten unterscheiden. Dies konnte innerhalb unterschiedlichster phytopathogener Gattungen wie z. B. *Fusarium* oder *Phytophthora* gezeigt werden (Ma et al., 2010; Raffaele et al., 2010). Ähnliches wurde für verschiedene Arten aus derselben Familie, wie der der Echten Mehltäupilze (*Erysiphaceae*) beobachtet (Spanu et al., 2010). Im Fall der Art *M. oryzae* wurden auch beim Vergleich der Genome verschiedener Isolate deutlich, dass sich diese ebenfalls im Effektorrepertoire unterscheiden (Yoshida et al., 2009; Xue et al., 2012; Chen et al., 2013a). Da die verglichenen Arten oder Isolate jeweils mit verschiedenen Wirtspflanzen assoziiert sind, kann angenommen werden, dass das Effektorrepertoire Pathogenität und Wirtspektrum bestimmt, woraus folgt, dass Veränderungen in Effektorgenen die Anpassung an verschiedene Wirtspflanzen möglich machen (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011).

Um der Frage nachzugehen, ob Gene, die für die Effektorkandidaten (*MoHEGs*) kodieren in *M. grisea* ebenfalls vorhanden oder verändert vorhanden sind, wurden die orthologen Gene (*MgHEGs*), mit freundlicher Unterstützung von Dr. Thomas Kroj (INRA, Montpellier), identifiziert. Da Isolate der Art *Magnaporthe grisea* mit der Wirtspflanze *Digitaria* assoziiert sind (Couch and Kohn, 2002), können sie Wirtspflanzen von *M. oryzae*, wie Reis oder Gerste, nicht kolonisieren (Zellerhoff et al., 2006). Aus diesem Grund wurden Transkriptabundanzanalysen der *MgHEGs* in Infektionszeitreihen der immunsupprimierten Gerstensorte Nigrate durchgeführt und deren Regulierung mit der der *MoHEGs* verglichen. Um Interaktion zwischen *M. grisea* und Nigrate cytologisch zu überprüfen, wurde zunächst die Interaktion zwischen *M. grisea* und *Digitaria sanguinalis* mikroskopisch charakterisiert (Samantha Langer, Bachelorarbeit, 2012). Darüber hinaus war es möglich die orthologen *MgNLPs*, analog zu den *MoNLPs*, auf die Fähigkeit der Nekroseinduktion in *N. benthamiana* zu untersuchen.

3.4.1 Cytologische Untersuchungen der Interaktion zwischen *Magnaporthe* und der Fingerhirse (*D. sanguinalis*)

Zur näheren Analyse von Wirt- und Nichtwirtinteraktion zwischen *Digitaria* und *M. grisea* (Isolat BR29) bzw. *M. oryzae* (Isolat TH6772), wurde der Infektionsphänotyp dieser Interaktionen nach Inokulation, in einer von mir betreuten Bachelorarbeit, zunächst makroskopisch bestimmt (Abbildung 20A+B) und anschließend in einer Kinetik von 24, 48 und 72 h p.i. vergleichend mikroskopisch analysiert (Abbildung 20C) (S. Langer, Bachelorarbeit, 2012). Entsprechende Pflanzen wurden dazu mit Sporensuspension des jeweiligen Isolates (250.000 Sporen pro mL) inoku-

liert und die Ausprägung von Symptomen nach 4-5 Tagen dokumentiert. BR29 verursachte dabei bereits 72 h nach der Inokulation heftige Symptome auf *Digitaria* (Abbildung 20A), wobei Blätter, die mit TH6772 inokuliert waren, auch noch 96 h nach Inokulation symptomfrei blieben (Abbildung 20B).

Nach der makroskopischen Analyse wurde die Interaktion zwischen dem Wirtisolat BR29 bzw. dem Nichtwirtisolat TH6772 und *Digitaria* mikroskopisch ausgewertet. Dazu wurden 24, 48 und 72 h nach Inokulation Blätter geerntet, entfärbt und durch Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Pro Blatt wurden mindestens 100 Interaktionsstellen ausgezählt und kategorisiert. Durch die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie wird Autofluoreszenz in Zellwandappositionen oder der ganzen Zellwand sichtbar gemacht, dies deutet, wie schon in verschiedenen Veröffentlichungen angewendet, im ersten Fall auf die Bildung einer Papille oder im zweiten Fall auf die Einleitung von programmiertem Zelltod hin (Koga, 1994; Jarosch et al., 1999; Faivre-Rampant et al., 2008). Zur Auswertung wurden die folgenden sieben Kategorien gewählt, welche im Wesentlichen denen unter Abschnitt 3.2.2 entsprachen:

1. KS (Keimschlauch): Eine Spore war mit Keimschlauch ausgekeimt. Fluoreszenz war in dieser Kategorie nicht zu beobachten.
2. App (Appressorium): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert. Fluoreszenz war auch in dieser Kategorie nicht zu beobachten.
3. Pap (Papille): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert, unter dem eine Zellwandverstärkung (Papille) zu erkennen war. Diese konnte als Penetrationsbarriere für den Pilz dienen und war je nach Ausprägung auch lichtmikroskopisch erkennbar. Unter Auflichtfluoreszenz fluoreszieren Papillen durch die Einlagerung phenolischer Verbindungen und sind dadurch leichter zu erkennen.
4. HR (Hypersensitive Reaktion): Die sich unter einem Appressorium befindliche Epidermiszelle fluoreszierte, was einen Indikator für das Einleiten eines programmierten Zelltods darstellt. Da der Pilz in der frühen Phase des Lebenszyklus auf lebendes Gewebe angewiesen ist, sorgte eine solche so genannte Hypersensitive Reaktion für das Absterben des Pathogens und wird somit als Abwehrreaktion bewertet.
5. PHR (Papille und Hypersensitive Reaktion): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert, unter dem eine fluoreszierende Zellwandverstärkung (Papille) zu erkennen war. Zusätzlich fluoreszierte die, sich unter dem Appressorium befindliche, Epidermiszelle. Dies deutete darauf hin, dass zusätzlich zu der gebildeten Papille eine hypersensitive Reaktion eingeleitet wurde.

6. Glob (Globuläre Mesophyllzellen): Die sich unter einem Appressorium befindlichen Mesophyllzellen schienen rund und fluoreszierten. Der Pilz konnte das Mesophyll des Blattes erreichen, der resultierende Zelltod wurde durch Autofluoreszenz sichtbar, wobei die Struktur der Zellen erhalten blieb. Auch diese Hypersensitive Reaktion wird hier als Abwehrreaktion der Pflanzenzelle bewertet.
7. Col (Kollabierte Mesophyllzellen): Die sich unter einem Appressorium befindlichen Mesophyllzellen fluoreszierten und hatten dabei ihre natürliche runde Form verloren, d.h. sie waren kollabiert. Der Pilz konnte demnach das Mesophyll des Blattes kolonisieren, wodurch die Struktur der Zellen nur noch in Form von fluoreszierenden Strichen erkennbar war.

Repräsentative Bilder der einzelnen Kategorien können in der Bachelorarbeit von S. Langer eingesehen werden (2012). Bei der mikroskopischen Analyse wurde deutlich, dass nach 24 h p.i., in rund 70 % der Interaktionsstellen in der Wirt- und in ca. 60 % der Interaktionsstellen der Nichtwirtinteraktion, Appressorien ausgeprägt waren (Abbildung 20C). Das bedeutet, dass die Entwicklung beider Isolate in Bezug auf Keimung und Appressorienbildung zunächst ähnlich verlief. In der Wirtinteraktion stiegen schließlich zu 48 h p.i. die Anteile in den Kategorien an, die Reaktionen innerhalb der Gewebsschichten (Epidermis und Mesophyll) betrafen. Die Anzahl an Interaktionsstellen, die der Kategorie „Appressorium“ zugeordnet werden konnten, verringerte sich über den zeitlichen Verlauf, was darauf hindeutet, dass sich der Pilz über die Keimung und Appressoriendifferenzierung hinaus entwickeln konnte. Im Gegensatz dazu ist zu erkennen, dass sich der Anteil an Interaktionsstellen in der Nichtwirtinteraktion über die verschiedenen Zeitpunkte kaum veränderte. Das Nichtwirtisolat verblieb in der frühen Entwicklungsphase und konnte kaum in die Epidermiszellen eindringen (ca. 2 % über alle Zeitpunkte). Kategorien, die Reaktionen im Mesophyll betreffen, konnten entsprechend während der Nichtwirtinteraktion überhaupt nicht beobachtet werden. Die Kategorie „Appressorium“ ist daher auch die am stärksten vertretene Kategorie in der Nichtwirtinteraktion zu allen Zeitpunkten.

Während Gerstenpflanzen der Sorte Ingrid sowohl in Wirt- als auch in der Nichtwirtinteraktion mit *Magnaporthe* einen relativ hohen Anteil von über 60 % Papillen ausbilden (Jarosch et al., 1999; Zellerhoff et al., 2006), ist der Anteil an Papillen, den *Digitaria* ausbildet, mit rund 10-20 % sehr viel geringer. Jedoch blieb der Anteil an Papillen, der während beiden Interaktionstypen ausgebildet wurde, über alle Zeitpunkte relativ unverändert. Das deutet darauf hin, dass Papillen, die gebildet wurden, den Pilz effektiv eingrenzten. Eine Ausnahme dazu ist der Anstieg des Anteils der Kategorie „Papille“ zu 72 h p.i. in der Nichtwirtinteraktion. Hier schien der Pilz nach langer Penetrationsphase doch noch die Papillenbildung zu induzieren. Ähnlich verhielt es

sich mit der Kategorie „Hypersensitive Reaktion“. Auch hier änderte sich der Anteil an Interaktionsstellen nur geringfügig.

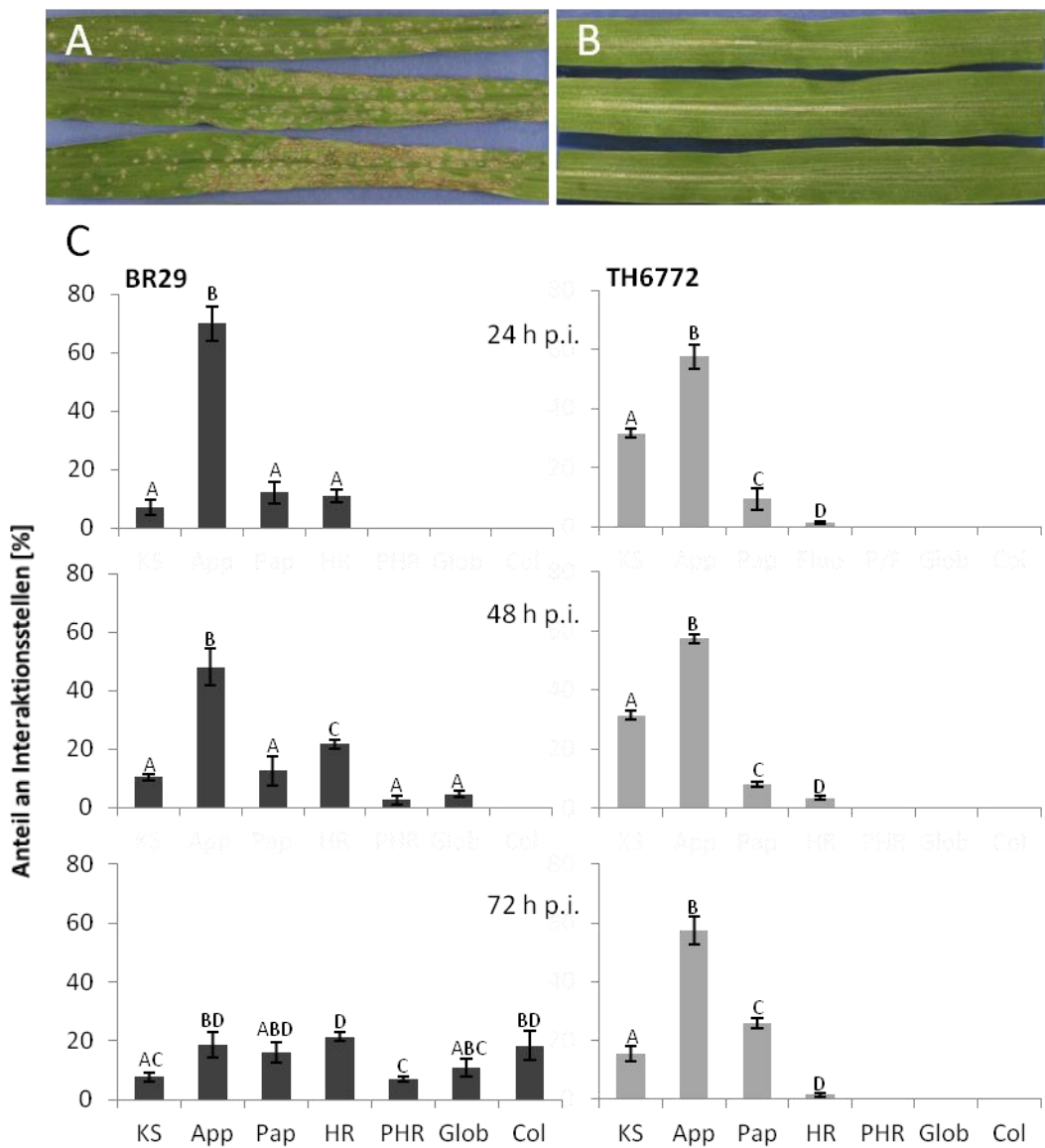


Abbildung 20: Makroskopische und mikroskopische Analyse der Interaktion zwischen *Digitalia sanguinalis* und dem *M. oryzae* Isolat TH6772 bzw. dem *M. grisea* Isolat BR29. *D. sanguinalis* Pflanzen wurden mit Sporen des *M. oryzae* Isolat TH6772 bzw. Sporen des *M. grisea* Isolat BR29 (250.000 Sporen/mL) inokuliert. Nach 72 h p.i. für BR29 (A) und nach 96 h p.i. für TH6772 (B) wurde der Infektionsphänotyp von *D. sanguinalis* bestimmt. Für die mikroskopische Analyse wurden zu 24, 48 und 72 h p.i. jeweils Blätter geerntet und entfärbt. Pro Interaktion und Zeitpunkt wurden je 3 Blätter licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen kategorisiert (C). Angezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, statistisch signifikante Unterschiede sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (t-Test, $p < 0,05$, 95 % Vertrauensbereich). Dieser Versuch wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt. Daten stammen aus der Bachelorarbeit von S. Langer (2012).

3.4.2 Analyse von Effektorkandidaten aus *M. grisea* Isolat BR29

Durch die Resequenzierung verschiedener *Magnaporthe* Isolate am INRA (Montpellier, unveröffentlicht), war es möglich, orthologe Sequenzen zu den *MoHEGs* innerhalb des Genoms des *M. grisea* Isolates BR29 zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass zu 14 der 18 *MoHEGs* orthologe *MgHEGs* existieren. Innerhalb der erhaltenen Sequenzen wurde zunächst der offene Leserahmen jedes *MgHEGs* identifiziert. Dies wurde mit Hilfe der Genvorhersage-Software von ©SoftBerry, Inc. (FGENESH) durchgeführt (Solovyev et al., 2006). Die Software bestimmte neben Start- und Stoppcodon auch die potenziellen Introns und Exons (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>). Für alle *MgHEGs*, außer *MgHEG5* und *MgHEG18*, konnte eine mit Startcodon beginnende kodierende Sequenz determiniert werden.

Anschließend wurde eine Vorhersage über das Vorhandensein eines Signalpeptids durchgeführt. Dies wurde mit der Software SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011) und WoLF PSORT (Horton et al., 2007) bestimmt. Da für *MgHEG5* und *MgHEG18* keine komplette mit Startcodon beginnende Nukleotidsequenz identifiziert werden konnte, war es nicht verwunderlich, dass ebenfalls kein Signalpeptid gefunden werden konnte. Für alle anderen *MgHEGs* konnte ein Signalpeptid bestimmt werden und bei der Analyse durch WoLF PSORT, wurden alle *MgHEGs* als „extrazellulär“ bestimmt. Die Sequenzen der Transkripte aller *MgHEGs* befinden sich im Anhang (s. Tabelle 7, S. 132).

Der Vergleich zwischen *MgHEGs* und korrespondierenden *MoHEGs* ist in Tabelle 6 dargestellt. Die Tabelle enthält neben der Anzahl an Aminosäuren und Cysteinresten, die prozentuale Ähnlichkeit zu den *MoHEGs*. Diese ist bezogen auf Nukleotidsequenz, Aminosäuresequenz und Aminosäuresequenz ohne Signalpeptide (reifes Protein) und wurde durch ein Global-Ref Alignment der orthologen Gene bzw. Proteine mit der Software von Clone Manager (Version 8) durchgeführt. Es wird deutlich, dass die Ähnlichkeit auf Nukleotidebene mit durchschnittlich 75,8 % am größten ist. Vergleicht man die Zahlen zwischen dem Alignment auf Proteinebene mit und ohne Signalpeptid, fällt auf, dass sie sich nur um einige wenige Prozent unterscheiden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ähnlichkeiten auf der Ebene des reifen Proteins, zwischen den orthologen HEGs stark variieren, sie belaufen sich zwischen 35 % bei HEG9 (sogar 15 % beim Alignment der unvollständigen Sequenz von HEG18) und 95 % bei HEG15. Im Gegensatz dazu schwanken die Unterschiede zwischen den HEGs auf Nukleotidebene in einer kleineren Spanne zwischen ca. 60-80 % (Ausnahme *HEG18*, jedoch handelt es sich hier um ein Alignment mit unvollständiger Sequenz).

Tabelle 6: MgHEGs im Vergleich zum entsprechenden Ortholog aus *M. oryzae* (MoHEG).

<i>MgHEG</i> ^a	AS (Cys) ^b	Ähnlichkeit zu MoHEGs (Proteinle- vel) [%] ^c	Ähnlichkeit zu MoHEGs (Proteinle- vel) ohne SP [%] ^d	Ähnlichkeit zu MoHEGs (Nukleo- tidlevel) [%] ^e
1	102 (10)	54	56	65
2	102 (8)	70	67	77
3	119 (7)	53	48	72
4	220 (5)	69	69	78
5	[179 (5)]*	-	[66]	[75]
7	209 (4)	79	81	83
8	204 (1)	61	59	72
9	135 (3)	42	35	59
12	147 (4)	46	38	57
14	171 (2)	90	90	88
15	101 (6)	95	95	92
16	149 (8)	77	77	85
17	100 (8)	79	81	82
18	[108 (5)]*	-	[15]	[40]
		̄67,9	̄66,3	̄75,8

^afortlaufende Nummer der *MgHEGs*^bAnzahl der Aminosäuren des korrespondierenden Proteins inklusive der enthaltenen Cysteinreste^cÄhnlichkeit der *MgHEGs* zu dem entsprechenden *MoHEG* [%] auf Proteinebene^dÄhnlichkeit der *MgHEGs* zu dem entsprechenden *MoHEG* [%] auf Ebene des reifen Proteins (Protein ohne Signalpeptid)^eÄhnlichkeit der *MgHEGs* zu dem entsprechenden *MoHEG* [%] auf Nukleotidebene*Sequenzen von *MoHEG5* und *MoHEG18* waren im Bereich des N-Terminus unvollständig, weswegen die Werte in eckigen Klammern dargestellt sind (weitere Erläuterung siehe Text).

Da, wie oben genannt, die Sequenzen von *MgHEG5* und *MgHEG18* nicht vollständig vorhanden waren, wurde das Alignment auf Nukleotidebene entsprechend mit den unvollständigen Sequenzen durchgeführt. Aus diesem Grund sind die Ähnlichkeiten zwischen der Sequenz von *MgHEG5* und *MgHEG18* und dem orthologen *MoHEG* in eckigen Klammern dargestellt. Auf Proteinebene wurden nur die reifen *MgHEGs*, *MgHEG5* und *MgHEG18*, mit den entsprechenden *MoHEG* Sequenzen verglichen, da Sequenzinformation am N-Terminus der Proteine, und damit das jeweilige Signalpeptid, fehlte.

3.4.2.1 Die Interaktion zwischen *M. grisea* Isolat BR29 und der Gerstensorte Nigrate

Im weiteren Verlauf des Projekts sollten Transkriptabundanzanalysen zu den *MgHEGs* während der Wirtinteraktion durchgeführt werden, um deren Regulierung mit der der *MoHEGs* zu vergleichen. Die natürliche Wirtspflanze des *M. grisea* Isolates BR29 ist *D. sanguinalis*, doch konnten trotz der Möglichkeit die Epidermis separat von den darunter liegenden Gewebsschichten zu ernten, Transkripte der *MgHEGs* in diesem Gewebe nur mit großen Unregelmäßigkeiten detek-

tiert werden (vgl. S. Langer, Bachelorarbeit, 2012). Aus diesem Grund wurde die Expression der *MgHEGs* in BR29 während der Interaktion mit einem japanischen, immunsupprimierten Gerstenskultivar (Nigrate) analysiert. Dazu wurden zunächst eine makroskopische sowie mikroskopische Untersuchungen durchgeführt, um die Kompatibilität zwischen *M. grisea* Isolat und Gerstensorte zu überprüfen.

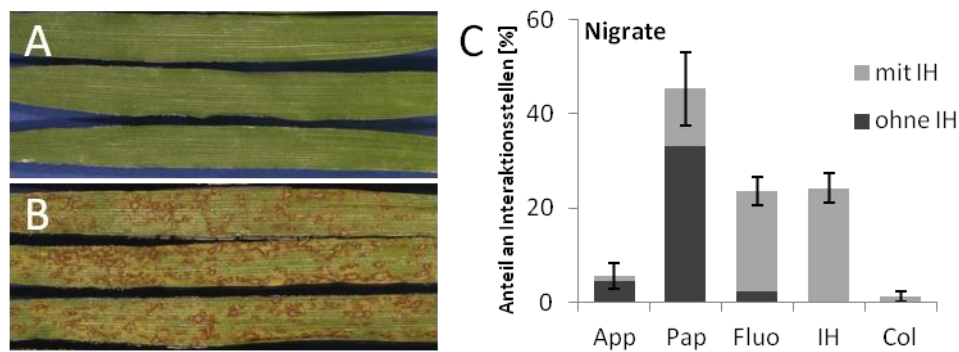


Abbildung 21: Makroskopische und mikroskopische Analyse der Interaktion zwischen dem *M. grisea* Isolat BR29 und der Gerstensorte Nigrate. Pflanzen der Gerstensorten Ingrid und Nigrate wurden mit Sporen des *M. grisea* Isolat BR29 (250.000 Sporen/mL) inokuliert. Nach ca. 6 Tagen wurde der Infektionsphänotyp von Ingrid (A) und Nigrate (B) bestimmt. Für die mikroskopische Analyse der Interaktion zwischen *M. grisea* Isolat BR29 und Nigrate wurden zu 48 h p.i. jeweils 3 Primärblätter geerntet und entfärbt. Pro Interaktion und Zeitpunkt wurden je 3 Blätter licht- bzw. fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen kategorisiert (C). Dabei wurden die Kategorien „Appressorium“ (App), „Papille“ (Pap), „Fluoreszierende Epidermiszelle“ (Fluo), „Invasive Hyphen“ (IH) und „Kollabiertes Mesophyll“ (Col) unterschieden. Angezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

In Abbildung 21 A und B ist die makroskopische Analyse des Infektionsphänotyps der Gerstensorten Ingrid und Nigrate nach Inokulation mit BR29 gezeigt. Während auch nach einer Woche auf der Gerstensorte Ingrid keine Blastsymptome vorhanden waren (A), konnte BR29 sich auf der Sorte Nigrate etablieren und bereits nach 5 Tagen deutliche Symptome ausprägen (B). Es handelt sich also bei der BR29-Nigrate-Interaktion um eine kompatible Interaktion.

Um diese Kompatibilität auch mikroskopisch zu zeigen, wurde die Interaktion zwischen BR29 und Nigrate zu 48 h p.i. quantitativ ausgewertet (C). Da invasive Hyphen (IH) in der Gerstensorte Nigrate besonders deutlich zu erkennen sind, wurde innerhalb der zur quantitativen Auswertung verwendeten Kategorien unterschieden, ob invasive Hyphen vorhanden waren (mit IH) oder nicht (ohne IH). Es wurden ähnlich zu der bereits beschriebenen mikroskopischen Auswertung, die Kategorien „Appressorium“, „Papille“, „Fluoreszierende Epidermiszelle“, „Invasive Hyphen“ und „Kollabiertes Mesophyll“ unterschieden (s. 3.2.2). Der sehr hohe Anteil invasiver Hyphen von 90 % innerhalb der Kategorie „Fluoreszierende Epidermiszelle“ ließ darauf schließen, dass Epidermisfluoreszenz in dieser Interaktion nicht als Kategorien zur Eingrenzung des Pathogens (HR, vgl. 3.4.1, 4.) zu bewerten war, weshalb die Bezeichnung „Fluoreszierende Epidermiszelle“

anstelle „Hypersensitive Reaktion“ gewählt wurde. Der Zelltod, der hier durch die Fluoreszenz der Zellwand zu erkennen war, konnte den Pilz nicht eindämmen, sondern schien hier durch diesen verursacht zu sein.

Auffällig in der Interaktion zwischen BR29 und Nigrate war der hohe Anteil an Papillen, welcher für die Interaktion zwischen Gerste und *Magnaporthe* typisch zu sein scheint (s. Erläuterungen in 3.4.1). Zum untersuchten Zeitpunkt 48 h p.i. war der Pilz darüber hinaus bereits in das Gewebe hineingewachsen, was daran zu erkennen ist, dass sich bereits ein Anteil von jeweils über 20 % der Interaktionsstellen in Epidermis und Mesophyll befand. Es ist also auch auf mikroskopischer Ebene festzustellen, dass es sich bei der Interaktion zwischen BR29 und Nigrate um eine kompatible Interaktion handelt. Eine umfassendere cytologische Analyse der Interaktion zwischen Nigrate und verschiedenen *Magnaporthe* Isolaten, wurde im Rahmen der Dissertation von Rhoda Delventhal (2015) durchgeführt.

3.4.2.2 Transkriptabundanzanalysen der *MgHEGs* durch RT-qPCR

Die Transkriptabundanzanalysen der *MgHEGs* wurden während der Interaktion zwischen BR29 und dem immunsupprimierten Gerstenkultivar Nigrate durchgeführt (s. 3.4.2.1). Da es möglich war, die Epidermis der Gerstensorte Nigrate separat von den darunter liegenden Zellschichten zu ernten, konnten die Transkriptabundanzanalysen der *MgHEGs*, analog zu denen der *MoHEGs*, in epidermalemem Gewebe durchgeführt werden. Es wurden auf der Basis der vorhergesagten Gensequenzen (s. 3.4.2) RT-qPCR Primer designt.

Bei näherer Betrachtung der Expressionsprofile der *MgHEGs* fiel auf, dass auch hier, analog zu den *MoHEGs*, die maximalen Transkriptabundanzen in der biotrophen Phase des Lebenszyklus zu detektieren waren. Entsprechend ließ sich auch hier zwischen Frühen und Späten *MgHEGs* (vor und während der Penetration bzw. während der Kolonisierung der Wirtspflanze) unterscheiden (s. Abbildung 22, weiße und schwarze Balken). *MgHEG5*, *MgHEG7*, *MgHEG16*, *MgHEG17* und *MgHEG18* können zu den Frühen *MgHEGs*, alle anderen zu den Späten *MgHEGs* gezählt werden. Interessanterweise entsprach dies genau den entsprechenden Frühen bzw. Späten *MoHEGs* und spricht dafür, dass die Regulation der orthologen Gene in beiden *Magnaporthe* Arten ähnlich ist (vgl. Abbildung 4).

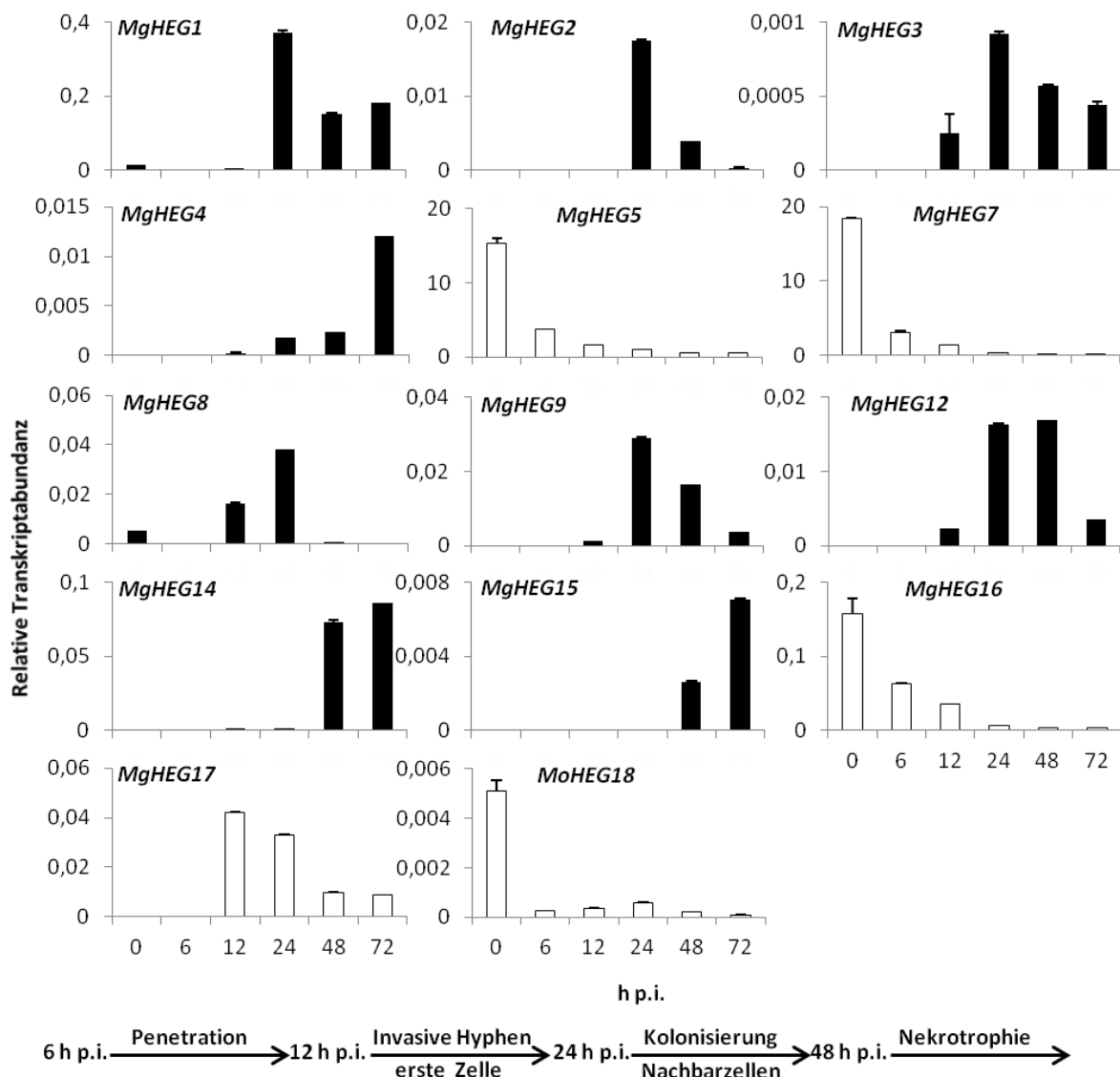


Abbildung 22: Erstellen von Expressionsprofilen der *MgHEGs* durch RT-qPCR. Gerstenpflanzen der Sorte Nigrate wurden mit dem *M. grisea* Wirtisolat BR29 inokuliert (750.000 Sporen/mL) und die Epidermis von ca. 10-20 Primärblättern nach 0, 6, 12, 24, 48 und 72 h p.i. geerntet. Die Pilzentwicklung ist im zeitlichen Verlauf durch einen Zeitstrahl angedeutet. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden die Transkriptabundanz der *MgHEGs* relativ zu dem konstitutiven exprimierten Gen *EF1α* mit Hilfe gen-spezifischer Primer bestimmt. Weiße Säulen heben Frühe *MgHEGs* hervor, schwarze Säulen stellen Späte *MgHEGs* dar. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate. Transkriptabundanzanalysen zu den *MgHEGs* wurden in einem unabhängigen biologischen Replikate mit einer kürzeren Zeitreihe (6-48 h p.i.) mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Grundsätzlich ist allerdings zu bemerken, dass der Zeitpunkt der maximalen Transkriptabundanz, im Vergleich zu dem der *MoHEGs*, um einen Zeitpunkt nach vorn verschoben ist (vgl. Abbildung 4). So haben die Frühen *MgHEGs* ihr Expressionsmaximum bereits unmittelbar nach der Inokulation bzw. vor der Keimung erreicht (Ausnahmen *MgHEG17*) und die Späten *MgHEGs* ihr Transkriptionsmaximum nach 24 h, statt wie die *MoHEGs* nach 48 h p.i. erreicht. Eine Erklärung hierfür ist zum einen, dass es sich bei einer Pathogen-Wirt-Interaktion um ein biologisches

System handelt, welches den natürlichen Schwankungen der Pathogenese unterliegen kann. Zum anderen jedoch zeigte das wiederholte Arbeiten mit *M. grisea* Isolat BR29, dass die Entwicklung dieses Isolats in einer kompatiblen Interaktion schneller verlief als die Entwicklung von *M. oryzae* Isolat TH6772 in einer kompatiblen Interaktion. So waren Blastsymptomen bei BR29 generell 1-2 Tage früher zu beobachten als bei *M. oryzae*. Dies stellt auch den Grund dar, warum die Kinetik der Expression der *MgHEGs* bereits nach 72 h p.i. statt nach 96 h p.i. endete. Nach 72 h waren die Blätter bereits vollständig kollabiert und damit die nekrotrophe Phase des Lebenszyklus erreicht. Es ist entsprechend festzuhalten, dass diese Verschiebung in der Kinetik beim direkten Vergleich der beiden Spezies den realen Entwicklungsbedingungen entsprach.

Beim Vergleich der Expressionsprofile der *MgHEGs* und der *MoHEGs* zeigten sich große Ähnlichkeiten. Ausnahme bilden hier nur *MgHEG4* und *MgHEG14*. Diese beiden Gene sind in der Interaktion zwischen BR29 und Nigrate sehr spät hochreguliert. In der Interaktion zwischen TH6775 und Ingrid dagegen sind die entsprechenden *MoHEGs* *MoHEG4* und *MoHEG14* deutlich früher reguliert (vgl. Abbildung 4). Dies stellt den entsprechend umgekehrten Fall zur oben beschriebenen zeitlichen Verschiebung dar.

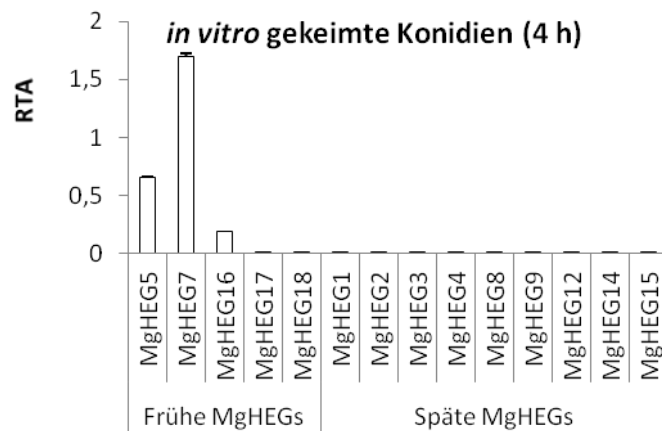


Abbildung 23: Relative Transkriptakkumulation der *MgHEGs* in *in vitro* gekeimten Sporen. Konidien des *M. grisea* Isolat BR29 wurden auf Glasplatten aufgesprüht und in einer Kammer mit 100 % Luftfeuchtigkeit 4 h keimen gelassen. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden mit Hilfe von RT-qPCR die Transkriptabundanz der *MgHEGs* relativ zu dem konstitutiven exprimierten Gen *EF1 α* mit Hilfe Gen-spezifischer Primer bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate. RTA: relative Transkriptabundanz. Daten stammen aus der Bachelorarbeit von S. Langer (2012). Von diesem Versuch wurden zwei unabhängige biologische Replikate mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Zusätzlich zu den Transkriptabundanzanalysen der *MgHEGs* während der Pathogen-Wirt-Interaktion, wurde ihre Expression, analog zu 3.1.3.1, in *in vitro* gekeimten Konidiosporen durchgeführt. Auch hier sollte geklärt werden, ob *MgHEGs*, besonders diejenigen mit frühem Expressionsmaximum während der Konidienkeimung, unabhängig von der Gegenwart einer

Wirtspflanze reguliert sind. Dazu wurden Konidien des Isolates BR29 in einer feuchten Kammer auf Glasplatten gekeimt und 4 h vor Appressorienbildung geerntet. Bei der anschließenden Genexpressionsanalyse stellte sich heraus, dass auch hier ausschließlich Transkripte der Frühen *MgHEGs*, mit Ausnahme von *MgHEG17* und *MgHEG18*, detektierbar waren (Abbildung 23). Späte *MgHEGs* wurden entweder nicht detektiert (n.d.) oder mit geringem basalem Level.

Bei der *in vitro* Expressionsanalyse der *MoHEGs* (vgl. Abbildung 5) waren am meisten Transkripte von *MoHEG16* detektierbar. Im Fall der *MgHEGs* war *MgHEG16* am geringsten exprimiert. Darüber hinaus waren in *M. oryzae* Isolat TH6772 während der Keimung Transkripte von *MoHEG18* detektierbar. Transkripte von *MgHEG18* waren dagegen bei der Keimung von BR29 nicht messbar. Das Expressionsmuster der orthologen *HEGs* unterscheidet sich entsprechend bei der Keimung zwischen *M. oryzae* und *M. grisea*, jedoch können Transkripte Später *HEGs* in keinem Fall detektiert werden. Ihre Expression der *HEGs* scheint entsprechend abhängig von einem späteren Entwicklungsstadium des Pilzes. Im Fall von *HEG17* konnten sowohl bei *M. oryzae* als auch bei *M. grisea* keine Transkripte während *in vitro* Keimung detektiert werden. Dieses Frühe *HEG* besitzt allerdings sein Expressionsmaximum sowohl in TH6772 als auch in BR29 jeweils bei 12 h p.i., was ein späteres Maximum als das der anderen Frühen *HEGs* darstellt.

3.4.3 Untersuchung der Zelltod induzierenden Wirkung von MgNLPs

Der Zugang zu Sequenzdaten des *M. grisea* Isolates BR29 mit freundlicher Unterstützung von Dr. Thomas Kroj (INRA Montpellier), erlaubte der Frage nachzugehen, ob auch in dieser *Magnaporthe*-Art Orthologe zu den Genen der *MoNLPs* im Genom vorhanden waren und ob diese ähnlich der *MoNLPs* eine Zelltod induzierende Eigenschaft besaßen (vgl. 3.3.1.1). Zusätzlich wurde analog zur Untersuchung der *MoNLPs* ebenfalls untersucht, ob ChEC3 den *MgNLP* vermittelten Zelltod supprimieren kann. Dies sollte ein Anhaltspunkt darauf sein, ob der Wirkmechanismus der *MgNLPs* dem der bislang getesteten *NLPs* entsprach. Es konnte zu jedem *MoNLP* ein orthologes Gen in *M. grisea* ermittelt werden.

Zur Ermittlung der Zelltod induzierenden Wirkung der *MgNLPs* wurde, analog zu den *MoNLPs*, ein *Agrobacterium tumefaciens* vermitteltes, transientes Expressionssystem in *N. benthamiana* verwendet (vgl. 3.3.1.1). Auch hier wurde als Kontrolle für Zelltodinduktion (Positivkontrolle) das *NLP* aus *C. higginsianum* verwendet, das in diesem Testsystem eine starke Nekrose induziert. Als Kontrollprotein, das keine Nekrose induziert, diente wiederum ebenfalls YFP (Negativkontrolle). Wiederum wurden *A. tumefaciens*, welche Konstrukte für Positiv- oder Negativkontrolle enthielten in die eine, *A. tumefaciens*, welche Konstrukte für das zu untersuchende *MgNLP* enthielten, in die andere Blatthälfte infiltriert. Infiltrationsstellen wurden wiederum nach 6 Tagen ausgewertet (s. Abbildung 24A).

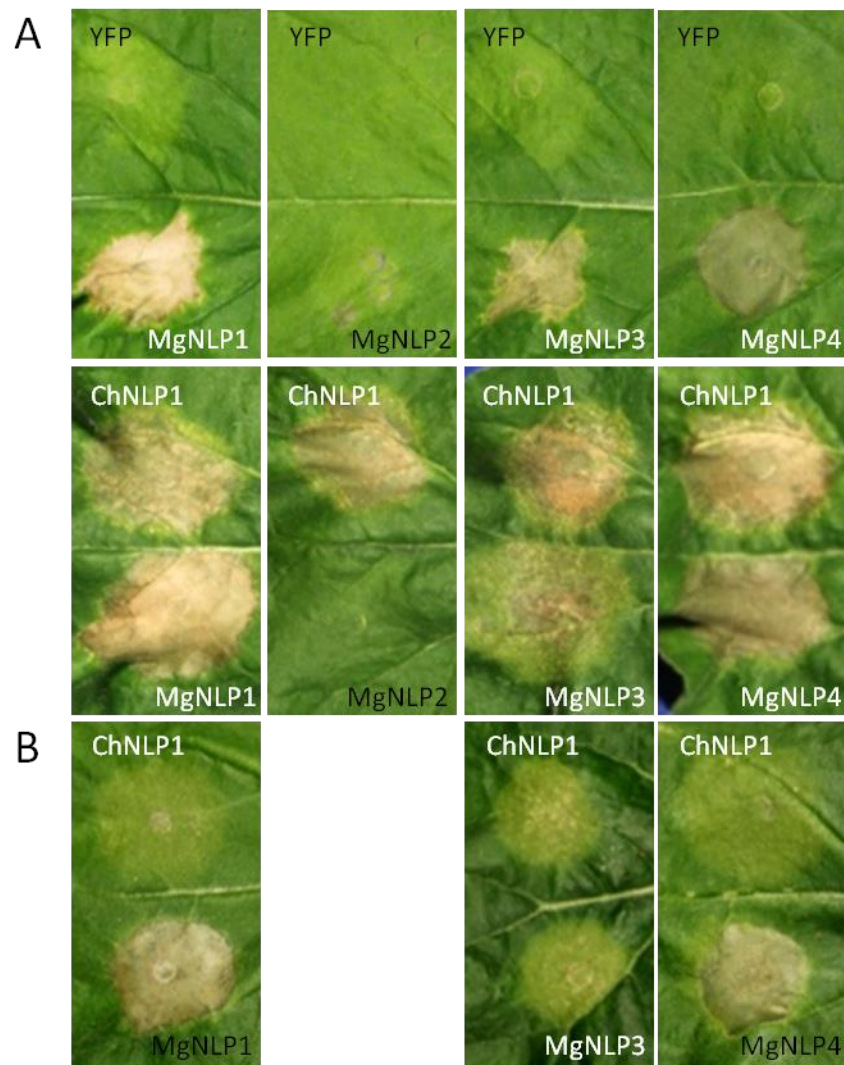


Abbildung 24: Analyse der Zelltod induzierenden Wirkung der MgNLPs durch *Agrobacterium tumefaciens* (*A.t.*) vermittelte transiente Transformation. *A.t.* Hauptkulturen wurden mit einer OD von 0,5 in die Blattunterseite 5-6 Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert und die Nekroseninduktion nach 6 Tagen ausgewertet. *A.t.* Kulturen trugen jeweils ein Konstrukt, das für ein MgNLP, ein Kontrollprotein oder ChEC3 kodierte. Als Kontrollproteine fungierten YFP (Protein ohne Zelltod induzierende Wirkung, Negativkontrolle) oder ChNLP1 (NLP mit Zelltod induzierender Wirkung aus *C. higginsianum*, Positivkontrolle). Das Effektorprotein ChEC3 supprimiert ChNLP vermittelten Zelltod, weshalb eine Co-Infiltration der *A.t.* Kulturen, die jeweils ein Konstrukt, das für ChNLP oder ChEC3 kodierte, enthielten, eine Kontrolle für Zelltodunterdrückung (Positivkontrolle) darstellte. *A.t.* Kulturen, die Konstrukte für MoNLP oder ein Kontrollprotein trugen wurden jeweils einzeln (A) oder zu gleichen Teilen mit der *A.t.* Kultur, die das Konstrukt für ChEC3 trug, gemischt (B). Ein positives Ergebnis des Tests (Zelltodinduktion oder Zelltodunterdrückung) ist mit weißer Schrift, ein negatives Ergebnis (keine Zelltodinduktion oder keine Zelltodunterdrückung) mit schwarzer Schrift gekennzeichnet. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass die transiente Expression von MgNLP1 und MgNLP4 einen starken lokalen Zelltod innerhalb des infiltrierten Bereichs induzierten. Durch Expression von MgNLP3 wurde ebenfalls eine Nekrose ausgelöst, jedoch erschien diese schwächer bzw. ungleichmäßiger und unregelmäßiger. MgNLP2 löste im Gegensatz dazu in keinem Fall eine Nekrose aus. In der

Abbildung 24 wird die Induktion einer Nekrose durch weiße Schrift, keine Nekroseinduktion mit schwarzer Schrift hervorgehoben.

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von ChEC3 auf den MgNLP-vermittelten Zelltod untersucht (Abbildung 24B). Dazu wurden, analog zum Vorgehen bei den MoNLPs, *A. tumefaciens*, welche Konstrukte für das zu untersuchende MgNLP trugen mit *A. tumefaciens*, welche Konstrukte für ChEC3 trugen co-infiltriert. Nach 6 Tagen wurde ausgewertet, ob sich eine Nekrose ausbilden konnte oder nicht. Es stellte sich heraus, dass Nekrosen, die durch MgNLP1 oder MgNLP4 induziert wurden nicht durch eine gleichzeitige Expression von ChEC3 unterdrückt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde die Nekrose, die durch MgNLP3 verursacht wurde, durch ChEC3 supprimiert. Der Effekt der Zelltodunterdrückung wurde in der Abbildung mit weißer Schrift hervorgehoben.

Beim Vergleich der Wirkung der MgNLPs mit der der MoNLPs, fällt auf, dass MoNLP2, im Gegensatz zu MgNLP2, Zelltod induziert. Umgekehrt jedoch löst MoNLP3 keine Nekrose aus, MgNLP3 dagegen schon. Die Wirkung der Orthologen ist also entsprechend umgekehrt. Ein weiterer Unterschied zwischen dem MoNLP vermitteltem Zelltod und dem MgNLP vermitteltem Zelltod war, dass sich der MoNLP vermittelte ausnahmslos von ChEC3 unterdrücken lässt. Die durch MgNLP1 und MgNLP4 induzierte Nekrose ließ sich in keinem Fall von ChEC3 unterdrücken.

3.5 MoNUDIX als potenzieller Pathogenitätsfaktor

NUDIX Hydrolasen katalysieren die Hydrolyse von organischen Pyrophosphaten, wie Nucleosiddiphosphat oder Nucleosidtriphosphat (McLennan, 2006). Ein charakteristisches Merkmal aller NUDIX Hydrolasen ist die so genannte NUDIX Box ($Gx_5Ex_5[UA]xREx_2EExGU$), ein Bereich in der Proteinsequenz, der maßgeblich daran beteiligt ist essentielle zweiwertige Kationen zu binden.

M. oryzae besitzt ein Homolog von *CtNUDIX*, ein für eine NUDIX Hydrolase kodierendes Gen aus *Colletotrichum truncatum*, das unmittelbar vor dem Wechsel von biotropher zu nekrotropher Phase exprimiert wird (Bhadauria et al., 2013). *MoNUDIX* entspricht dem Gen MGG_14156 des Isolates 70-15 (Broad Institute, 6. Assembly) und liegt auf Chromosom VI an Position 4,644,433. Desweiteren existiert in 70-15 ein Paralog (Genduplikat), MGG_14344, welches sich an nicht bekannter Stelle innerhalb des *M. oryzae* Genoms befindet. Beide Gene besitzen kein Intron. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob *MoNUDIX* analoge Funktionen zu *CtNUDIX* besitzt und somit zu einer neu postulierten Effektorklasse hemibiotropher, pilzlicher und pilz-ähnlicher Phytopathogene zu zählen ist (Bhadauria et al., 2013). Interessanterweise wurde *MoNUDIX* unter den 157 Effektorkandidaten, als differenziell reguliert während der Interaktion zwischen dem *M. oryzae* Isolat TH6772 und Gerste, gefunden (Dissertation R. Delventhal, 2015; siehe auch 3.1.1).

3.5.1 NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung *Magnaporthe*

Auf Grund der Resequenzierung verschiedener *Magnaporthe* Isolate am INRA, Montpellier, war es möglich, mit freundlicher Unterstützung von Dr. Thomas Kroj, Sequenzinformationen der NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung zu erhalten. Zu den resequenzierten Isolaten gehörten die Reisisolate FR13, Guy11, TH12, TH16 und PH14, welche der Art *M. oryzae* zugeordnet werden, das mit der Gattung *Setaria* (Borstenhirse) assoziierte Pilzisolat US71, ein mit *Eleusine* (Fingerhirse, engl. finger-millet) assoziiertes Isolat, CD156, weiterhin das mit Weizen assoziierte Isolat BR32 und schließlich das mit *Digitaria* (Fingerhirse, engl. finger-grass oder crabgrass) assoziierte Isolat BR29.

Interessanterweise stellte sich heraus, dass die Reisisolate, im Gegensatz zu 70-15, jeweils nur ein NUDIX Gen ohne Duplikation besaßen, dagegen konnten in den Isolaten, die mit *Setaria* oder *Eleusine* assoziiert sind, jeweils zwei verschiedene NUDIX Gene gefunden werden. Das mit Weizen assoziierte Isolat besaß keine NUDIX Hydrolase, das Isolat von *Digitaria* dagegen 2-4 NUDIX Gene. Von diesen 2-4 Genen konnten allerdings nur zwei eindeutig den sekretierten NUDIX Hyd-

rolasen zugeordnet werden *BR29NUDIX1* und *BR29NUDIX2*. Bei *BR29NUDIX3* handelt es sich möglicherweise um eine falsch annotierte oder nicht sekretierte NUDIX Hydrolase, was sich aus dem Blast-P Alignment mit der Datenbank ergab. Das Gen *BR29NUDIX4* wurde durch den ebenfalls durchgeführten T-Blast-N identifiziert und besitzt eine homologe Region zu MoNUDIX, dieses Gen konnte aber nicht annotiert werden (Informationen T. Kroj).

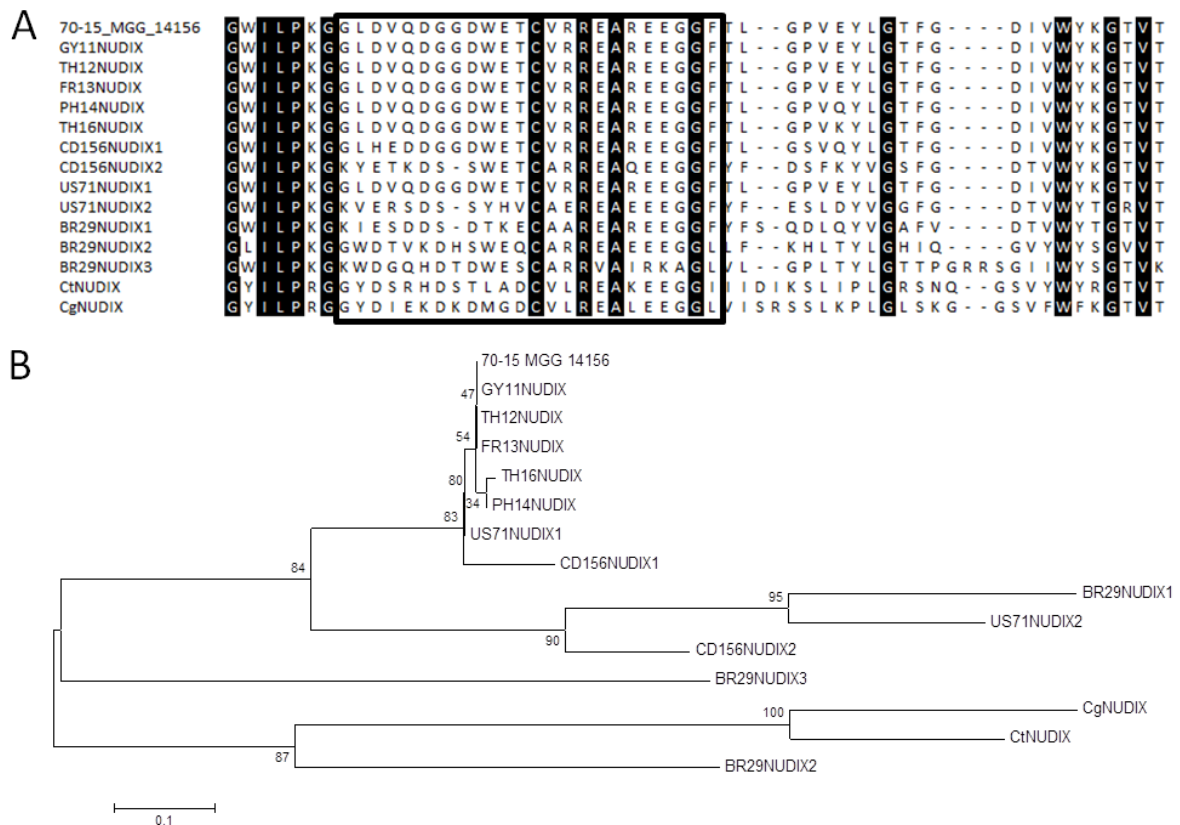


Abbildung 25: NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung *Pyricularia*. Sequenzen der *Pyricularia* NUDIX Hydrolasen der Reisolat 70-15, Guy11, TH12, FR13, TH16 und PH14, dem *Setaria* Isolat US71, dem *Eleusine* Isolat CD156 und dem *Digitaria* Isolat BR29, sowie die *Colletotrichum* NUDIX Hydrolasen aus *C. truncatum* (CtNUDIX) und *C. graminicola* (CgNUDIX) wurden mit ClustalW miteinander verglichen (A) und in eine Maximum-Likelihood-Analyse eingesetzt (B). An den Knotenpunkten des phylogenetischen Stammbaumes sind jeweils die „bootstrap support“-Ziffern angegeben, welche auf jeweils 1000 Wiederholungen basieren. Der angegebene Maßstab repräsentiert 10 % Sequenzabweichung (Divergenz).

Abbildung 25A zeigt die Sequenzen der NUDIX Hydrolasen aller o.g. resequenzierter Isolate im Bereich der NUDIX Box. MGG_14344 ist dabei nicht zusätzlich zu MGG_14156 aufgeführt, da beide Sequenzen identisch sind. Zusätzlich sind die NUDIX Hydrolasen aus *C. truncatum* (CtNUDIX) und *C. graminicola* (CgNUDIX) gezeigt. Die verwandtschaftlichen Verhältnisse der NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung *Pyricularia* sind in Abbildung 25B dargestellt. Es wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit der Maximum-Likelihood-Methode (von engl. maximale Wahrscheinlichkeit) durchgeführt. Dabei wurde die Bootstrap Methode mit 1000 Wiederholungen angewendet. Der so entstandene Stammbaum zeigte ein nahes Verwandtschaftsverhältnis aller

NUDIX Hydrolasen innerhalb der Reisisolate durch Bildung eines eigenen Zweiges. Darüber hinaus wurde jeweils eine NUDIX Hydrolase aus den jeweils zwei Gene enthaltenen Isolaten, US71 und CD156 der Wirtpflanzen *Setaria* bzw. *Eleusine*, ebenfalls diesem Zweig zugeordnet (US71NUDIX1 und CD156NUDIX1). Die andere NUDIX Hydrolase dieser beiden Isolate wurde jeweils einem zweiten Zweig zugeordnet, zu dem auch ein NUDIX Gen aus BR29, assoziiert mit der Wirtpflanze *Digitaria*, gehört. Das zweite Gen aus BR29 kann einem entfernten Ast zugeordnet werden, der beide NUDIX Hydrolasen aus den *Colletotrichum* Arten *C. truncatum* und *C. graminicola* (CgNUDIX), enthält. Die dritte, ggf. falsch annotierte NUDIX Hydrolase aus BR29 bildet einen eigenen Zweig.

3.5.2 Expression von MoNUDIX während Pathogen-Wirt-Interaktion

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, welches Expressionsprofil NUDIX Hydrolasen innerhalb der Gattung *Pyricularia* während der Pathogen-Wirt-Interaktion besitzen und wann die maximale Transkriptabundanz messbar ist. Die NUDIX Hydrolase aus *C. truncatum* besitzt ein Expressionsmaximum unmittelbar vor dem BNS (Bhadoria et al., 2013). Ob sich ein ähnliches Bild für *Pyricularia* NUDIX Hydrolasen bietet, wurde durch eine RT-qPCR-Analyse ermittelt. Es wurde die Expression von *MoNUDIX* (gleichermaßen Transkripte von MGG_14156 und MGG_14344) während der *M. oryzae* TH6772-Gerste-Interaktion und die Expression der NUDIX Hydrolasen aus BR29 während der Interaktion mit der immunsupprimierten Gerstensorte Nigrate (s. 3.4.2.1) untersucht. Dabei konnten in der BR29-Nigrate-Interaktion ausschließlich Transkripte von *BR29NUDIX1* detektiert werden.

Während Transkripte von *MoNUDIX* zu 0, 6 und 12 h p.i. noch nicht zu detektieren waren, stieg die Transkriptabundanz zu 48 h p.i. stark an (Abbildung 26A). Nach diesem starken Anstieg folgte ein fast ebenso steiler Abfall zu 96 h p.i. *Magnaporthe* kolonisiert zu 48 h p.i. während der Interaktion mit Gerste Wirtzellen mit biotrophen, invasiven Hyphen. Zu 72 h p.i. expandieren bereits dünne nekrotrophe Hyphen in Nachbarzellen (vgl. auch Abbildung 9, S.61), womit die nekrotrophe Phase des Lebenszyklus eingeleitet wird. Das Expressionsprofil von *MoNUDIX* deutet darauf hin, dass *MoNUDIX* unmittelbar vor dem BNS (zu 48 h p.i.) seine maximale Transkriptakkumulation erreichen könnte. Für *BR29NUDIX1* ergab sich ein ähnliches Expressionsprofil (Abbildung 26B). Auch hier wurde das Expressionsmaximum kurz vor dem BNS erreicht. Da BR29 allerdings einen etwas schnelleren Entwicklungszyklus besitzt als TH6772 (vgl. 3.4.2), sind bereits zu 24 h p.i. Transkripte akkumuliert und der starke Rückgang der relativen Transkriptmenge ist bereits zwischen 48 und 72 h p.i. zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich

festhalten, dass NUDIX Hydrolasen in *Magnaporthe*, die zu CtNUDIX homolog sind, ebenfalls vor dem BNS maximal exprimiert werden.

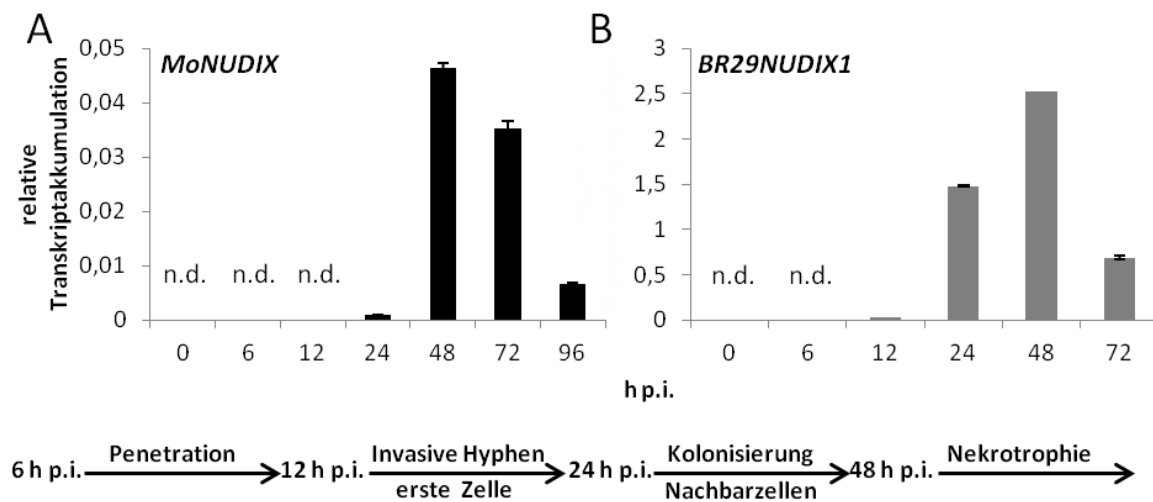


Abbildung 26: Expressionsprofile von *MoNUDIX* und *BR29NUDIX1* während Pathogen-Wirt-Interaktion. Gerstentpflanzen der Sorte Ingrid (A) bzw. Nigrate (B) wurden mit dem *M. oryzae* Wirtisolat TH6772 (A) bzw. dem *M. grisea* Isolat BR29 (B) inokuliert (750.000 Sporen/mL) und die Epidermis von ca. 10-20 Primärblättern nach 0, 6, 12, 24, 48 und 72 h p.i. (A+B) bzw. zusätzlich zu 96 h p.i. (A) geerntet. Die Pilzentwicklung ist im zeitlichen Verlauf durch einen Zeitstrahl angedeutet. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden die Transkriptabundanz von *MoNUDIX* (A) bzw. *BR29NUDIX1* (B) relativ zu dem konstitutiv exprimierten Gen *EF1α* mit Hilfe gen-spezifischer Primer bestimmt (n.d.: nicht detektierbar). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate. Die Expressionsanalysen wurden einmal durchgeführt.

3.5.3 Funktionale Analyse von *MoNUDIX*

Die funktionale Analyse von *MoNUDIX* wurde einerseits durch Überexpressionsanalyse und andererseits durch Silencing-Ansatz (engl. herunterregulieren) durchgeführt.

Der Mechanismus des Gene-Silencings oder Herunterregulierens von Genen durch RNAi in *Magnaporthe* konnte bereits gezeigt werden (Kadotani et al., 2003, 2004). Hierbei kommt es durch die Anwesenheit doppelsträngiger mRNA zum Knock-down der Transkriptmenge. Zum Silencing von *MoNUDIX* wurde ein Ansatz gewählt, bei dem das stillzulegende Gen zwischen zwei gegenläufige Überexpressionspromotoren aus *Aspergillus* kloniert wird (Nguyen et al., 2008). Durch die Transkription des Gens in beide Leserichtungen, kommt es zur Bildung der erforderlichen, doppelsträngigen mRNA. Die Entscheidung für einen Silencing Ansatz anstelle einer vollständigen Deletion, ergab sich aus der Tatsache, dass das zur Transformation verwendete Isolat 70-15 zwei identische Genkopien von *MoNUDIX* besitzt. Da zum Zeitpunkt der Transformation Informationen über die Anzahl der Gene in anderen *M. oryzae* Isolaten fehlte und für eine vollständige Deletion von MGG_14156 und MGG_14344 in 70-15 entsprechend die Generierung einer Doppelmutante nötig gewesen wäre, wurde der Silencing Ansatz gewählt.

Für die Überexpression von *MoNUDIX* wurde ein konstitutiver, *Magnaporthe*-spezifischer Promotor, RP27 (Ribosomales Protein 27), verwendet (Bruno et al., 2004).

3.5.3.1 Verifizierung der Transformanden

Zum Erzeugen von *MoNUDIX* Transformanden wurde eine PEG vermittelte Protoplastentransformation durchgeführt (vgl. auch 3.2.1). Bei dem für die Transformationen (Überexpression und Silencing) verwendeten Konstrukt handelte es sich immer um das gesamte Gen (Start bis Stopp). Nach Kultivierung der putativen Mutanten auf Selektionsmedium konnte nach DNA Extraktion durch PCR das Vorhandensein des Konstrukts in ca. 30 putativen Mutanten ermittelt werden (Vortest, nicht gezeigt). Zur näheren Analyse wurden anschließend drei putative Überexpressionsklone verwendet (OENUDIX-1, OENUDIX-2 und OENUDIX-3). Da das Gen *MoNUDIX* zum Silencing zwischen zwei gegenläufige Überexpressionspromotoren kloniert wurde, waren hier zweierlei Orientierungen der Gens möglich (engl. forward und reverse, vorwärts und rückwärts). Es wurden daher zur näheren Analyse jeweils zwei Mutanten mit Konstrukten der jeweiligen Orientierung ausgesucht (siNUDIX-1.1 und siNUDIX-1.2 in reverser Orientierung; siNUDIX-2.1 und siNUDIX-2.2 in forward Orientierung).

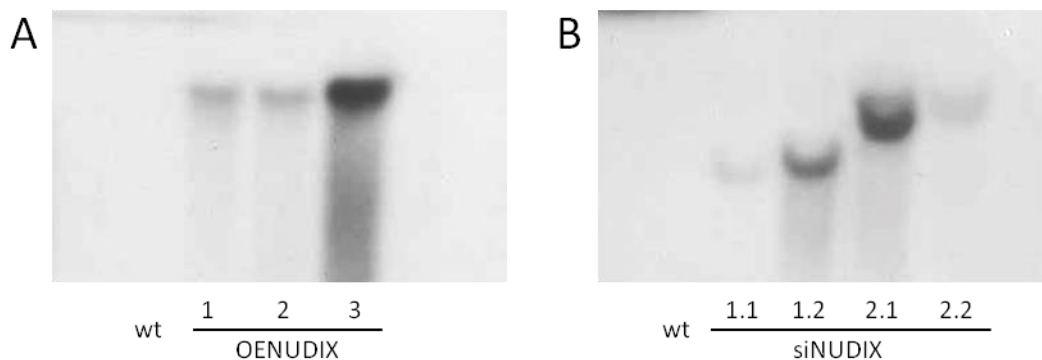


Abbildung 27: Southern Blot Analyse der *MoNUDIX* Mutanten. Genetischer Southern Blot der *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten OENUDIX-1, OENUDIX-2 und OENUDIX-3 (A), sowie der *MoNUDIX* Silencingmutanten siNUDIX-1.1, siNUDIX-1.2, siNUDIX-2.1 und siNUDIX-2.2 (B) mit entsprechender Wildtyp Kontrolle (wt). Genomische DNA wurde mit XhoI (A) bzw. BglII (B) verdaut. Eingesetzte Sonden waren jeweils spezifisch für die Antibiotikaresistenz vermittelnde Kasette, Hygromycin (A) bzw. Geneticin (B).

Da keine KO-Mutanten generiert wurden, sondern Überexpressionskassetten transformiert wurden, war der Integrationsort innerhalb des Genoms zufällig. Darüber hinaus waren durch die ungerichtete Transformation Mehrfachintegrationen möglich. Entsprechend war die Charakterisierung der putativen Transformanden nur durch einen Southern Blot möglich (Abbildung 27A+B). Es wurde eine jeweils spezifisch auf die Antibiotikaresistenz vermittelnde Expressions-

kassette hybridisierende Sonde verwendet. Im Fall der Überexpressionsmutanten entsprach dies Hygromycin, im Fall der Silencingmutanten entsprach dies Geneticin. Teilabbildung (A) zeigt dabei das Ergebnis der Southernblotanalyse der Überexpressionsmutanten, (B) den der Silencingmutanten. Im Fall der Überexpressionsmutanten wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym XhoI, im Fall der Silencingmutanten mit BglII geschnitten. Es wird deutlich, dass im Wildtyp, im Gegensatz zu den analysierten Mutanten, kein Konstrukt nachweisbar war. Dies bedeutet, dass es bei allem analysierten putativen Transformanden um positive Transformanden handelte. Im Fall der Transformanden siNUDIX-2.1 und siNUDIX-2.2 ließ sich nicht mit Bestimmtheit davon ausgehen, dass es sich um eine einzelne Integration handelte, da auf dem Röntgenfilm möglicherweise eine Doppelbande erkennbar ist.

Zusätzlich zu den durchgeführten Southern Blots, wurde eine Expressionskontrolle der Transkripte von *MoNUDIX* in den Transformanden durch RT-qPCR durchgeführt, da das bloße Vorhandensein einer Expressionskassette deren Expression nicht garantiert. Hierzu wurde einerseits RNA aus vegetativem Mycel für die Analyse der Überexpression verwendet, andererseits wurde für die Kontrolle der Effizienz des Silencings, RNA aus mit den entsprechenden Mutanten infizierter Gerstenepidermis verwendet.

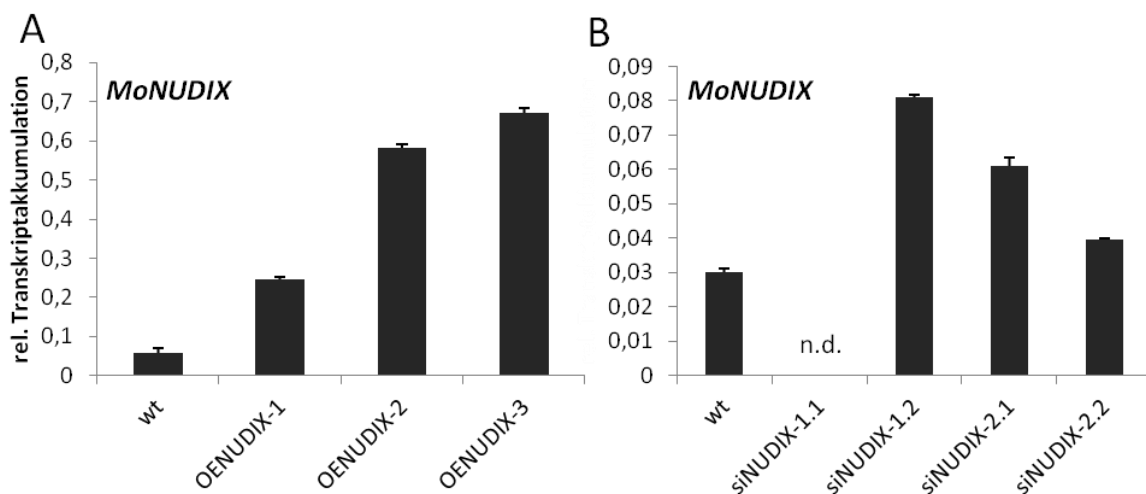


Abbildung 28: Transkriptabundanz von *MoNUDIX* in Wildtyp und *MoNUDIX* Mutanten. (A) Vegetatives Mycel des *M. oryzae* Wirtisolat 70-15 und der *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten OENUDIX-1, OENUDIX-2 und OENUDIX-3 wurde nach ca. 14 Tagen Wachstum auf CM-Agarplatten geerntet. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden die Transkriptabundanz von *MoNUDIX* relativ zu dem konstitutiven exprimierten Gen *EF1 α* mit Hilfe gen-spezifischer Primer bestimmt. (B) Gerstenpflanzen der Sorte Ingrid wurden mit dem *M. oryzae* Wirtisolat 70-15 und den *MoNUDIX* Silencingmutanten siNUDIX-1.1, siNUDIX-1.2, siNUDIX2.1 und siNUDIX-2.2 inokuliert und die Epidermis von ca. 10-20 Primärblättern nach 48 h p.i. geerntet. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich Pathogen und Wirtpflanze in der späten biotrophen Interaktionsphase. Nach Extraktion der RNA und anschließender cDNA-Synthese, wurden die Transkriptabundanz von *MoNUDIX* relativ zu dem konstitutiven exprimierten Gen *EF1 α* mit Hilfe gen-spezifischer Primer bestimmt (n.d.: nicht detektierbar). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung zweier technischer Replikate.

Abbildung 28A zeigt die relative Transkriptakkumulation von *MoNUDIX* im Wildtyp und unter dem konstitutiven Promotor RP27 (Bruno et al., 2004) in den Überexpressionsmutanten in vegetativem Mycel. Hierbei wird deutlich, dass die hier verwendeten Transformanden jeweils eine höhere Expression als der Wildtyp besitzen. Abbildung 28B zeigt die Transkriptabundanz von *MoNUDIX* im Wildtyp und den putativen Silencing-Mutanten in infizierter Gerstenepidermis zu 48 h p.i., wenn das Gen maximal reguliert wäre (s. 3.5.2). Es wird deutlich, dass ein effektives Silencing nur in siNUDIX-1.1 messbar ist, da hier im Vergleich zu den anderen untersuchten Silencing-Mutanten keine Transkripte von *MoNUDIX* detektierbar waren. Transkripte des konstitutiv exprimierten Referenzgens *EF1 α* (*M. oryzae* *Elongationsfaktor1 α*) dagegen konnten auch in siNUDIX-1.1 nachgewiesen werden. Das zeigt, dass generell eine RT-qPCR-Analyse möglich war.

3.5.3.2 Makroskopische Analyse der *MoNUDIX* Transformanden

Für die makroskopische Analyse der verifizierten *MoNUDIX* Transformanden wurde eine phänotypische Analyse durchgeführt. Diese umfasste einerseits das vegetative Wachstum auf verschiedenen Nährmedien und andererseits den Infektionsphänotyp auf den Wirtspflanzen Gerste und Reis. Hier sollten jeweils Abweichungen zwischen Wildtyp und den Mutanten untersucht werden.

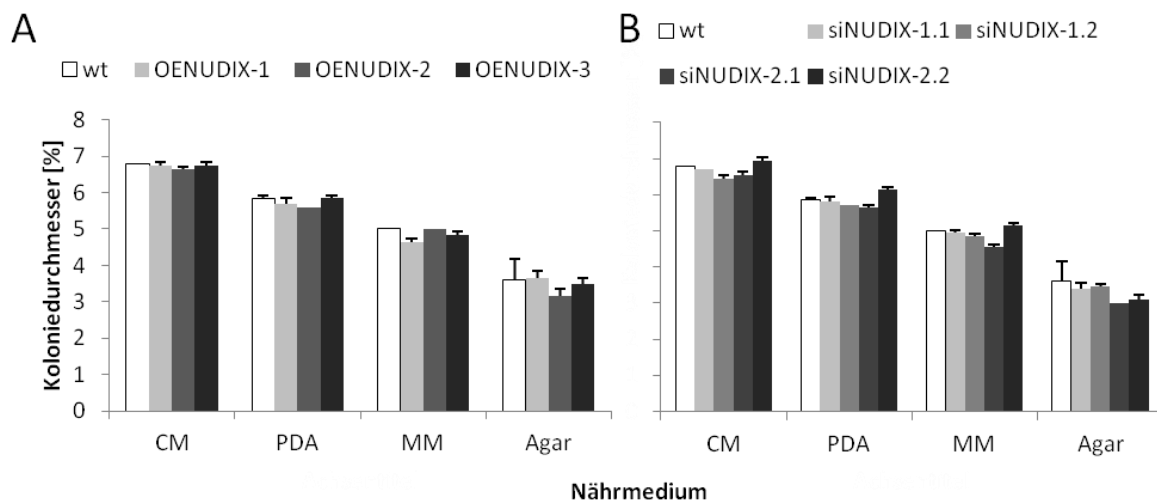


Abbildung 29: Wachstum der *MoNUDIX* Transformanden auf verschiedenen Nährmedien. *M. oryzae* Isolat 70-15 wt und *MoNUDIX* Überexpressions- (A) und Silencing-Transformanden (B) wurden in einer definierten Menge auf verschiedene Nährmedien ausgebracht (CM, Komplettnährmedium; PDA, Kartoffelstärkeagar; MM, Minimalmedium; Agar, 1,5 % Wasseragar) und der Koloniedurchmesser [cm] nach 12 Tagen bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert zweier Replikate und die Standardabweichung; keine Standardabweichung, wenn entsprechend kein Unterschied zwischen Replikaten.

Abbildung 29 zeigt den Koloniedurchmesser als Maß für das vegetative Wachstum von *M. oryzae* Isolat 70-15, Wildtyp, und den *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten (A) bzw. den *MoNUDIX* Silencingmutanten (B) auf verschiedene Nährmedien. Verwendet wurden dabei Komplettnutrientenmedium (CM), Kartoffelstärkeagar (PDA), Minimalmedium (MM) und 1,5 % Wasseragar (Agar). Nach 12 Tagen wurde der Durchmesser der gewachsenen Kolonie [cm] bestimmt. Es wird deutlich, dass keine hier auf diese Art analysierte Mutante einen abweichenden Phänotyp in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit zum Wildtyp besaß.

Im nächsten Schritt wurde eine phänotypische Analyse des *M. oryzae* Isolats 70-15, Wildtyp, und den *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten bzw. den *MoNUDIX* Silencingmutanten (Abbildung 30 bzw. Abbildung 31) auf den Gerstensorten Vada (A) und Ingrid (B) und der Reissorte Nipponbare durchgeführt. Auf Reis wurden jeweils eine Sprüh- (C) und eine Tropfeninokulation (D) vorgenommen. Im Fall der Überexpressionsmutanten zeigten sich in keinem Fall phänotypische Abweichungen zum Wildtyp (Abbildung 30), wobei durch Mutante OENUDIX-3 induzierte Blasts bei der Tropfeninokulation kleiner erschienen bzw. kein klar abgegrenztes, helles Zentrum enthielten. Im Fall der Silencingmutanten dagegen zeigte sich im Fall der Mutante siNUDIX-1.1 ein klar veränderter Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 31). Hier konnten keinerlei Krankheitssymptome auf Gerste oder Reis ausgeprägt werden. Bei der Tropfeninokulation nach Verwundung zeigten sich lediglich kleine Nekrosen, welche durch die vor der Tropfenapplikation durchgeführte Perforierung des Blattes entstanden waren.

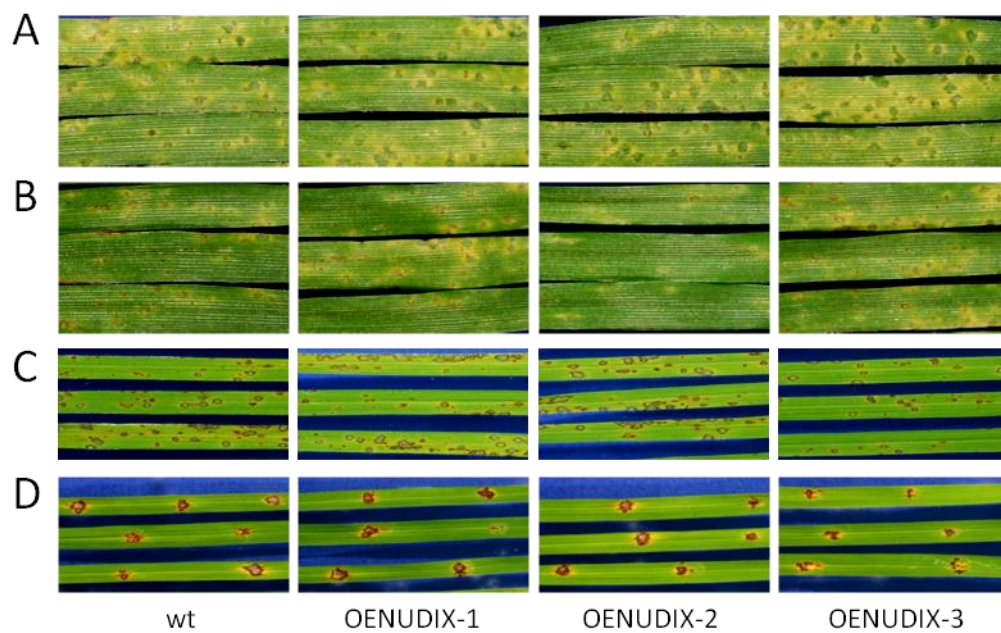


Abbildung 30: Infektionsphänotyp von *M. oryzae* 70-15 wt und *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten auf Gerste und Reis. Gerstenpflanzen der Sorten Vada (A) und Ingrid (B) und Reispflanzen der Sorte Nipponbare (C) wurden mit dem *M. oryzae* Isolat 70-15 und den *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten OENUDIX-1, OENUDIX-2 und OENUDIX-3 inokuliert (150.000 Sporen/mL) und der Infektionsphänotyp nach 5-7 Tagen ausgewertet. (D) Tertiärblätter der Reissorte Nipponbare wurden mit einer speziellen Zange perforiert und anschließend ein Tropfen Sporenlösung (4 μ L, 60.000 Sporen/mL) auf die perforierte Stelle appliziert. Der Infektionsphänotyp nach 7 Tagen ausgewertet.

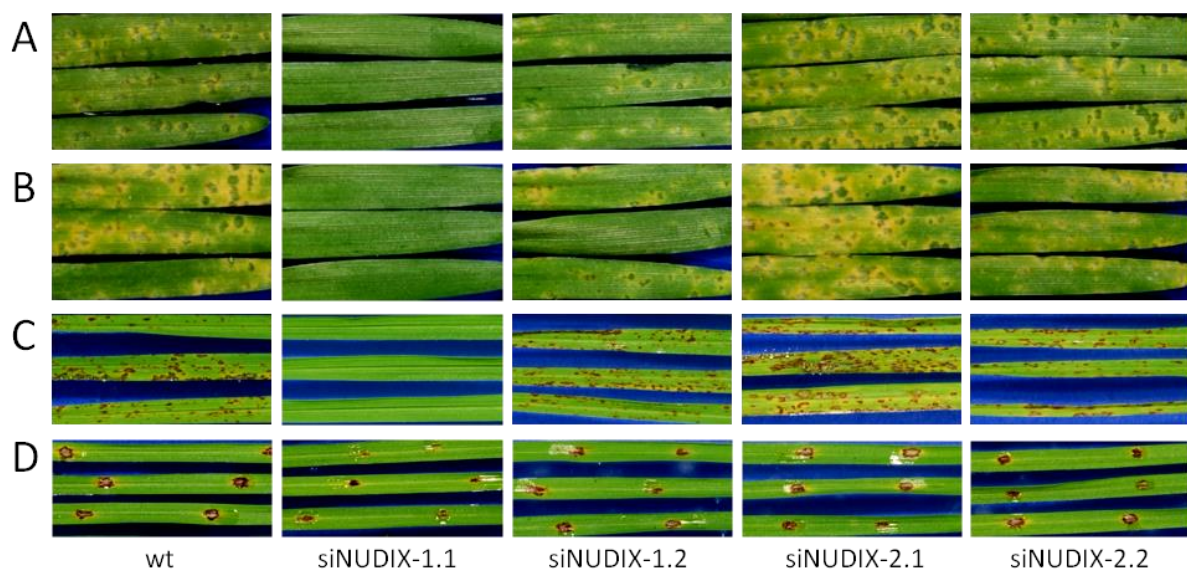


Abbildung 31: Infektionsphänotyp von *M. oryzae* 70-15 wt und *MoNUDIX* Silencingmutanten auf Gerste und Reis. Gerstenpflanzen der Sorten Vada (A) und Ingrid (B) bzw. Reispflanzen der Sorte Nipponbare (C) wurden mit dem *M. oryzae* Isolat 70-15 und den *MoNUDIX* Silencingmutanten siNUDIX-1.1, siNUDIX-1.2, siNUDIX-2.1 und siNUDIX-2.2 inokuliert (150.000 Sporen/mL) und der Infektionsphänotyp nach 5-7 Tagen ausgewertet. (D) Tertiärblätter der Reissorte Nipponbare wurden mit einer speziellen Zange perforiert und anschließend ein Tropfen Sporenlösung (4 μ L, 60.000 Sporen/mL) auf die perforierte Stelle appliziert. Der Infektionsphänotyp nach 7 Tagen ausgewertet.

3.5.3.3 Mikroskopische Analyse der MoNUDIX Mutanten

Nach der phänotypischen Analyse auf makroskopischer Ebene, schloss sich die phänotypische Analyse auf mikroskopischer Ebene an. Hierbei wurde ein verändertes Infektionsverhalten der *MoNUDIX* Mutanten im Vergleich zu *M. oryzae* 70-15, Wildtyp, auf zellulärer Ebene untersucht. Nur durch quantitative Auswertung einzelner Interaktionsstellen können auch minimale Abweichungen zwischen den einzelnen Genotypen detektiert werden.

Bei der Analyse der NUDIX Hydrolase aus *C. truncatum* wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression des Gens (*CtNUDIX*) und dem BNS vermutet. *C. truncatum* und *M. oryzae* Überexpressionsmutanten von *CtNUDIX* waren nicht in der Lage durch die Bildung von sekundären, nekrotrophen Hyphen von der primär infizierten Zelle in Nachbarzellen einzudringen (Bhadauria et al., 2013). Um eine evtl. ähnliche Funktion von MoNUDIX zu untersuchen, wurden Gerstenpflanzen der Sorte Vada in zwei unabhängigen Versuchen mit *M. oryzae* 70-15, wt, und den *MoNUDIX* Mutanten inokuliert. Nach 48 bzw. 72 h p.i. wurden jeweils drei Primärblätter geerntet und entfärbt. Pro Blatt wurden anschließend jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen in folgende Kategorien Interaktionsstellen (Interaktionstypen) eingeteilt:

1. oHY (ohne invasives Hyphenwachstum): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert, dabei waren keine invasiven Hyphen erkennbar. In einigen Fällen waren Konidiospore und Keimschlauch noch vorhanden.
2. HY (invasives Hyphenwachstum in der primär infizierten Epidermiszelle): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert, dabei waren biotrophe, blasige, invasive Hyphen erkennbar, die sich in der primär infizierten Epidermiszelle befanden.
3. nHY (invasives Hyphenwachstum in der primär infizierten Epidermiszelle und in sekundär infizierten Nachbarzellen): Ein Appressorium hatte sich ausdifferenziert, dabei waren biotrophe, blasige, invasive Hyphen in der primär infizierten Epidermiszelle erkennbar. Zusätzlich waren nekrotrophe, dünne, invasive Hyphen in sekundär infizierten Nachbarzellen zu beobachten.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Interaktionstypen sind der Abbildung 32A-C zu entnehmen. Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse beider unabhängiger Versuche zu 48 bzw. 72 h p.i. (Überexpressions- bzw. Silencingmutanten) zusammengenommen und alle drei Klone im Vergleich zum Wildtyp mittels t-Test (Überexpressionsmutanten) oder Mann-Whitney-Rangsummentest (Silencingmutanten) ($p > 0,05$, 95 % Vertrauensbereich) ausgewertet (Abbildung 33).

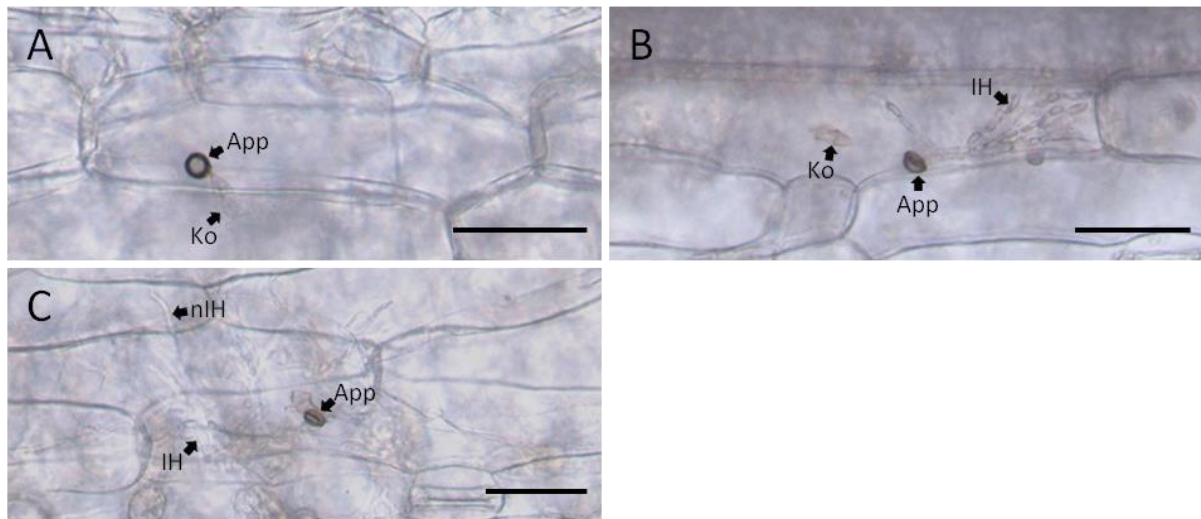


Abbildung 32: Kategorien der lichtmikroskopischen Auswertung der Interaktion zwischen *M. oryzae* Isolat 70-15, wt bzw. den *MoNUDIX* Mutanten und der Gerstensorte Vada. Während der Interaktion zwischen *M. oryzae* und der Gerstensorte Vada waren Interaktionsstellen zu 48 oder 72 h p.i. in typische Kategorien einzuteilen. (A) Koniidiospore (Ko) war ausgekeimt und ein melanisiertes Appressorium (App) sichtbar. (B) Unterhalb des Appressoriums waren in der infizierten Epidermiszelle blasige, invasive Hyphen (IH) erkennbar. (C) In der primär infizierten Epidermiszelle waren blasige, invasive Hyphen zu beobachten, zusätzlich waren nekrotrophe Hyphen (nIH) in sekundär infizierten Epidermiszellen vorhanden. Skalierungsbalken repräsentieren jeweils 50 µm.

Im Fall des mikroskopischen Vergleichs zwischen *M. oryzae* 70-15, wt und den *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten während der Interaktion mit Gerste, konnten innerhalb der Kategorien „ohne invasives Hyphenwachstum“ und „invasives Hyphenwachstum in der primär infizierten Epidermiszelle“ statistisch signifikante Unterschiede detektiert werden (Abbildung 33A). Diese äußerten sich darin, dass bereits nach 48 h p.i. weniger Interaktionsstellen keine invasiven Hyphen bzw. mehr Interaktionsstellen biotrophe, invasive Hyphen aufwiesen. Ausnahme bildete dabei die Mutante OENUDIX-2, bei der der verringerte Anteil des ersten Interaktionstyps zwar deutlich erkennbar war, jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Diese Ausprägung dieses veränderten Phänotyps der Überexpressionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp ist bei der Mutante OENUDIX-1 am stärksten ausgeprägt. Innerhalb der dritten Kategorie „invasives Hyphenwachstum in der primär infizierten Epidermiszelle und in sekundär infizierten Nachbarzellen“ waren dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Überexpressionsmutanten zu verzeichnen. Dies war auch nach 72 h p.i. nicht der Fall, Ausnahme bildete hier Mutante OENUDIX-3 in einem der beiden unabhängigen Versuche (nicht gezeigt). Dies konnte jedoch im zweiten unabhängigen Versuch und bei den anderen Überexpressionsmutanten nicht bestätigt werden. Es entstand daher der Eindruck, die zunächst schnellere Infektion der Überexpressionsmutanten, bezöge sich auf die Bildung biotropher, invasiver Hyphen, nicht jedoch auf die Bildung nekrotropher, invasiver Hyphen. Ein anderer Erklärungsansatz wäre,

dass der Vorsprung der Überexpressionsmutanten durch den Wildtyp aufgeholt werden konnte, so dass sich der Infektionsverlauf nach 72 h p.i. wieder angleichen konnte.

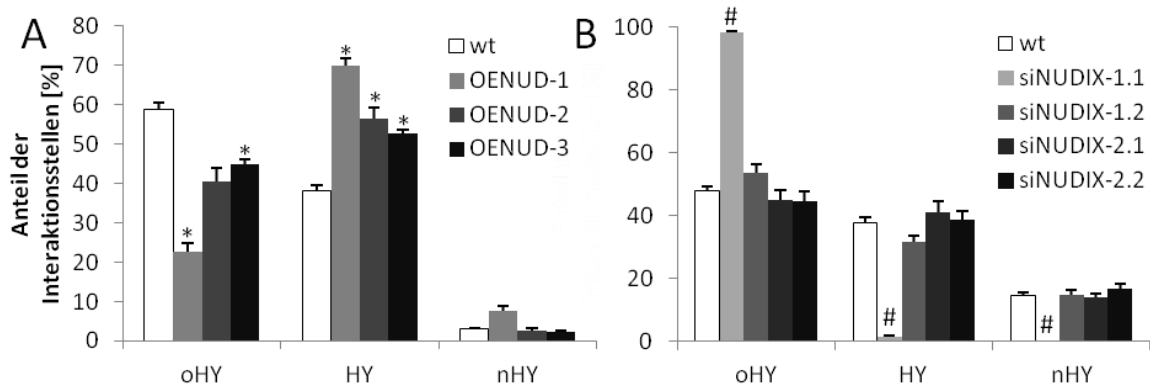


Abbildung 33: Lichtmikroskopische Analyse der Interaktion zwischen *M. oryzae* 70-15 bzw. den *MoNUDIX* Überexpressions- und Silencingmutanten mit der Gerstensorte Vada. Gerstenpflanzen der Sorte Vada wurden mit Sporen des *M. oryzae* Isolat 70-15 (Wildtyp) bzw. mit Sporen dreier unabhängiger *MoNUDIX* Überexpressionsmutanten (A) oder *MoNUDIX* Silencingmutanten (B) inokuliert. Für die mikroskopische Analyse wurden zu 48 (A) oder 72 h p.i. (B) in zwei unabhängigen Versuchen jeweils Primärblätter geerntet und entfärbt. Pro Versuch wurden je 3 Blätter ausgewertet. Dabei wurden jeweils mindestens 100 Interaktionsstellen kategorisiert und die Ergebnisse von drei Einzelversuchen zusammengefasst. Angezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * (t-Test, 95 % Vertrauensbereich) oder # (Mann-Whitney-Rangsummentest, 95 % Vertrauensbereich) gekennzeichnet.

Im Fall des mikroskopischen Vergleichs zwischen *M. oryzae* 70-15, wt und den *MoNUDIX* Silencingmutanten war der Phänotyp des Genotyps siNUDIX-1.1 besonders auffällig (Abbildung 33B). Interaktionsstellen zwischen siNUDIX-1.1 und Vada wurden zu fast 100 % dem ersten Interaktionstyp „ohne invasives Hyphenwachstum“ zugeordnet. Die Mutante war entsprechend auch nach 72 h p.i. kaum in der Lage invasive Hyphen auszubilden bzw. Wirtszellen zu kolonisieren. Dieses mikroskopische Bild erklärte die makroskopische Analyse (vgl. 3.5.3.2). Alle anderen Silencingmutanten zeigten dagegen keine Abweichung des Phänotyps im Vergleich zum Wildtyp.

3.5.3.4 Zelltodassay in *N. benthamiana* und *N. tabacum*

Agrobacterium tumefaciens vermittelte transiente Expression von CtNUP1 in *N. tabacum* induziert einen spezifischen Zelltod (Bhadauria et al., 2013). Um der Frage nachzugehen, ob MoNUP1 ebenfalls einen solchen Zelltod induzieren kann, wurde das Gen in das gleiche Testsystem eingesetzt wie ihrerseits die MoNLPs (s. 3.3.1.1). Dazu wurden wiederum Konstrukte, die für ChNLP1 oder YFP kodierten, als Kontrollen verwendet. Dabei stellte ChNLP1, das Zelltod in *N. benthamiana* induziert, wiederum die Positivkontrollen für Zelltodinduktion dar und YFP, für das keine Zelltod induzierende Wirkung bekannt ist, die Negativkontrolle für Zelltodinduktion. Zellen von *A. tumefaciens*, welche Konstrukte für die Expression der Kontrollproteine enthielten,

wurden jeweils in die eine Blatthälfte, entsprechende Zellen mit Konstrukten für das zu untersuchende MoNUDIX, in die andere Blatthälfte infiltriert (Abbildung 34A). Die Bildung von Nekrosen wurde nach 6 Tagen ausgewertet und äußerte sich durch braun, trocken und brüchig gewordenes Blattmaterial. Eine Zelltod induzierende Wirkung konnte für MoNUDIX weder in *N. tabacum* (B) noch in *N. benthamiana* (C) in keinem Fall ermittelt werden.

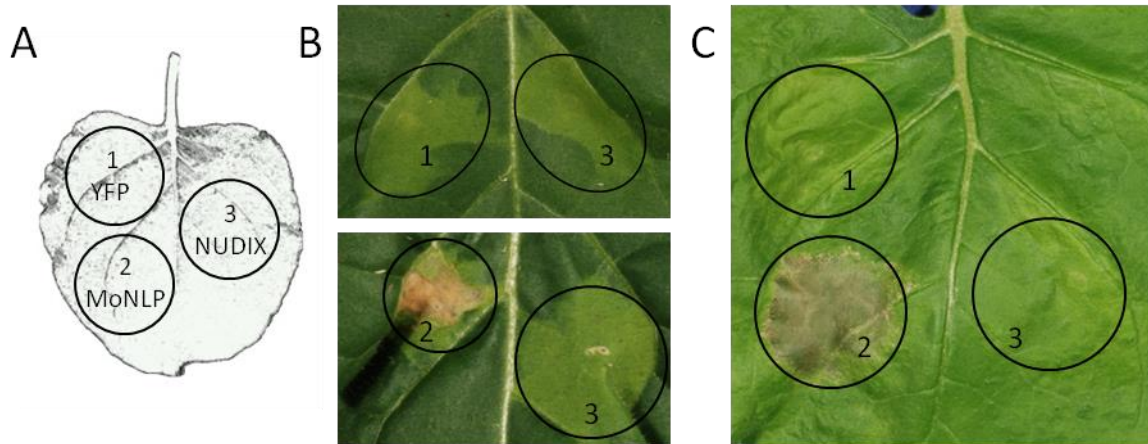


Abbildung 34: Transiente Expression von MoNUDIX in *N. tabacum* und *N. benthamiana*. *A.t.* Hauptkulturen wurden mit einer OD von 0,5 in die Blattunterseite 5-6 Wochen alter *N. tabacum* (B) oder *N. benthamiana* Pflanzen (C) infiltriert und die Nekroseninduktion nach 6 Tagen ausgewertet. Dabei wurden *A.t.* Kulturen mit jeweils einem Konstrukt, das für ein Kontrollproteine kodierte in die eine Blatthälfte und *A.t.* Kulturen mit einem Konstrukt, das für MoNUDIX kodierte, in die andere Blatthälfte infiltriert (A). Als Kontrollproteine fungierten dabei YFP (Protein ohne Zelltod induzierende Wirkung, Negativkontrolle) und ChNLP1 (NLP mit Zelltod induzierender Wirkung aus *C. higginsianum*, Positivkontrolle).

4 DISKUSSION

Phytopathogene Mikroorganismen sekretieren Effektormoleküle, die die pflanzliche Immunabwehr beeinflussen können. Durch die Sekretion von Effektoren können Pathogene einerseits die Immunabwehr der Wirtszelle umgehen oder schwächen, um sich damit erfolgreich zu etablieren (VIR-Effektoren). Andererseits können sekretierte Effektoren auch von Resistenzproteinen der Wirtszelle erkannt werden und somit spezifische Abwehrreaktionen induzieren. In solchen Fällen wirkt der Effektor als Avirulenz(AVR)-Effektor und das Pathogen kann sich nicht in der Wirtszelle etablieren. Effektoren haben somit einen entscheidenden Einfluss auf das Wirtsspektrum eines Pathogens (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011).

4.1 Identifizierung von Effektorkandidaten in *Magnaporthe oryzae*

Das Wirtsspektrum von Pilzen der Gattung *Pyricularia* ist innerhalb der Pflanzenfamilie der Süßgräser anzusiedeln, wobei über 50 verschiedene Arten befallen werden können (Fisher et al., 2012). Das Wirtsspektrum von Isolaten der Art *M. oryzae* ist in der Regel begrenzt, wobei einige der weltweit am häufigsten vorkommenden Anbaupflanzen, wie Reis, Weizen und Gerste, infiziert werden. Andere *Pyricularia* Arten sind mit Ziergräsern oder anderen, nicht domestizierten Gräsern wie Fingerhirsen (*Eleusine coracana* oder *Digitaria sanguinalis*), Fuchsschwanzhirse (*Setaria italica*) oder Lampenputzergras (*Pennisetum setaceum*) assoziiert (Couch and Kohn, 2002; Zellerhoff et al., 2006; Hyon et al., 2012).

Da das Effektorrepertoire einen entscheidenden Einfluss auf die Wirtsspezifität eines Pathogens hat (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011), wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine vergleichende Transkriptomstudie zwischen Wirt- und Nichtwirtinteraktion, d.h. zwischen einem Isolat der Art *P. oryzae* und einem Isolat der Art *P. penniseticola* (beide Arten gehören zu der Gattung *Pyricularia*) mit Gerste durchgeführt, um Effektorgene zu identifizieren, die für die Etablierung einer Wirtinteraktion von essenzieller Bedeutung sind (Delventhal, Dissertation, 2015). So konnten Kandidatengene identifiziert werden, die während der Wirtinteraktion zwischen dem *M. oryzae* Isolat TH6772 und Gerste signifikant höher exprimiert sind als während der Nichtwirtinteraktion zwischen dem *P. penniseticola* Isolat CD180 und Gerste.

Bislang ist die Identifizierung von Effektoren, die die Virulenz eines Pathogens begünstigen in pilzlichen Phytopathogenen eine große Herausforderung, da konservierte Sequenzmotive fehlen. Ein solches Motiv ist beispielsweise aus Oomyceten bekannt und vermittelt die Translokati-

on in die Wirtzelle (Whisson et al., 2007a). In einer der bislang veröffentlichten Studien zur Identifizierung von Effektoren aus *M. oryzae*, wurde das Transkriptom während vegetativem und *in planta* Wachstum in Reisblattscheiden verglichen (Mosquera et al., 2009). Hier wurden 262 *M. oryzae* Gene identifiziert, die in invasiven Hyphen im Vergleich zu in vegetativem Mycel induzierten Genen 10fach induziert waren. Interessanterweise sind einige Überschneidungen zwischen den so identifizierten *BAS* (Biotrophy-Associated Secreted) Genen und den in dieser Arbeit analysierten Späten *MoHEGs* zu verzeichnen (Tabelle 5). *BAS3* und *BAS4* wurden sogar ganz bewusst in die Auswahl der *MoHEGs* einbezogen, um deren Rolle während der *M. oryzae*-Gerste-Interaktion zu untersuchen. In der Liste der gesamten 157 putativen Effektorkandidaten befanden sich insgesamt sogar 29 Sequenzen, die auch in der Interaktion mit Reis differenziell reguliert waren (Delventhal, Dissertation, 2015). Dies deutet daraufhin, dass einige Effektoren aus *M. oryzae* in mehreren Wirtspflanzen, also Gerste und Reis, induziert sind. Dies wird auch beim Vergleich mit einer anderen Transkriptomanalyse deutlich. In dieser Studie wurden durch Microarrayexperimente das Transkriptom der *in planta* Kolonisierung von Reis bzw. Gerste mit dem Transkriptom von unter *in vitro*-Stress wachsendem Mycel verglichen (Mathioni et al., 2011). In diesem Rahmen wurden auch die *in planta* Transkriptome des verwendeten *M. oryzae* Isolats in Reis und Gerste nach 72 h p.i. miteinander verglichen. Dabei wurden 271 von 853 induzierten und 110 von 376 reprimierten Genen in Reis auch in Gerste gefunden, wobei die *BAS*-Proteine *BAS1*, *BAS2* und *BAS4* (Mosquera et al., 2009) unter diesen in Reis und Gerste regulierten Genen gefunden werden konnten (Mathioni et al., 2011). Dies deutet erneut darauf hin, dass in *M. oryzae* bei der Kolonisierung von Reis und Gerste teilweise dieselben Effektorgene exprimiert werden und lässt vermuten, dass diese in verschiedenen Wirtspflanzen Zielproteine besitzen könnten. Es wäre interessant zu untersuchen, ob diese Zielproteine in den Wirtspflanzen gleich sind oder ob die gleichen Effektoren in verschiedenen Wirten verschiedenen Zielproteine besitzen.

In derselben Studie wurden die Transkriptome in *M. oryzae* während *in vitro*-Stress mit *in planta* Kolonisierung von Reis bzw. Gerste verglichen (Mathioni et al., 2011). *In vitro*-Stress war hierbei plötzlicher Temperaturanstieg, oxidativer Stress oder Anzucht in Minimalmedium, Kohlenstoffmangel- oder Stickstoffmangel-Minimalmedium. Als Referenz wurde jeweils das Transkriptom einer vegetativ wachsenden Kultur in Kompletmedium verwendet. Interessanterweise wurde das *M. oryzae* Gen MGG_02239 (*MoHEG14*) unter allen *in planta* und *in vitro*-Stress Situationen induziert gefunden. Im Gegensatz dazu wurde MGG_11610 (*MoHEG1* bzw. *BAS3*) unter allen *in planta* und *in vitro*-Stress Situationen reprimiert gefunden. Dies macht deutlich, dass Überschneidungen in der Genregulierung zwischen *in planta* Wachstum und *in vitro* Stresssituatio-

nen bestehen und die *MoHEGs* *MoHEG14* und *MoHEG1* auch in einer weiteren Studie als *in planta* reguliert gefunden werden konnten.

In einer anderen Studie wurden durch das systematische Screening des öffentlich zugänglichen *M. oryzae* Genoms des Isolats 70-15 (Dean et al., 2005) 1306 putativ sekretierte Proteine identifiziert (Yoshida et al., 2009). Diese Kandidaten wurden anschließend auf Induktion während der Reisinfektion untersucht und die auf dies zutreffenden 78 Gene systematisch deletiert (Saitoh et al., 2012). Unter diesen 78 Genen befand sich auch das in dieser Arbeit untersuchte MGG_09378 (*MoHEG13*). Jedoch konnte durch die makroskopische Untersuchung der Deletionsmutanten im Rahmen der Studie keine verringerte Virulenz auf Reispflanzen der Sorte Shin No.2 festgestellt werden, weswegen MGG_09378 nicht als Virulenzeffektor eingestuft wurde (Saitoh et al., 2012). Jedoch konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine prägnante Funktion für dieses Protein ermittelt werden (s. 4.2.1).

Darüber hinaus wurde in einer im Jahr 2015 veröffentlichten Studie der Avirulenzeffektor AvrPi identifiziert (Wu et al.), der dem hier untersuchten Kandidatengen *MoHEG10* entspricht. All diese Überschneidungen der *MoHEGs* mit anderen veröffentlichten Studien zeigen deutlich, dass der hier verwendete Ansatz zu Identifizierung von Effektoren aus *M. oryzae* einen leistungsfähigen und zielführenden Ansatz darstellt.

Unter den für die nähere Analyse ausgewählten *MoHEGs* befanden sich drei Kandidatengene, deren korrespondierende Proteine ein so genanntes Y/F/WxC Motiv besitzen. Dieses Motiv wurde in Echem Mehltau (*Bgh*, *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Haustorien-ausbildenden Rostpilzen (*Pgt*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*; *Pt*, *Puccinia triticina*) entdeckt (Godfrey et al., 2010). Beide Pathogene besitzen ihr Wirtspektrum innerhalb der Süßgräser, weswegen spekuliert wurde, dass die konvergente Entwicklung von Effektoren mit diesem Motiv in einem Ascomyceten und einem Basidiomyceten durch die Wirtsspezifität bedingt wurde (Godfrey et al., 2010). Da das Wirtspektrum von *M. oryzae* ebenfalls innerhalb der Gattung der Süßgräser anzusiedeln ist, wurden unter den 157 putativen Effektorgenen auch solche für eine nähere Analyse ausgewählt, deren korrespondierende Proteine dieses Motiv innerhalb der ersten 30 Aminosäuren hinter dem Signalpeptid besitzen. So wurden *MoHEG16*, *MoHEG17* und *MoHEG18* in die Auswahl der *MoHEGs* aufgenommen. Die jedoch relativ geringe Anzahl von drei von 157 putativen Effektorgenen, die für Proteine mit diesem Motiv kodieren (ca. 2 %), scheint es jedoch zunächst als wichtiges Effektorkriterium in *M. oryzae* auszuschließen. Im Gegensatz dazu besaßen 19 % der haustoriellen Effektorkandidaten aus *Bgh* ein solches Motiv (Godfrey et al., 2010). Auch in einer anderen Studie besaßen 80 % der Effektorkandidaten aus *Bgh* (*CSEPs*, engl. *Candidates for Secreted Effector Proteins*) ein sehr ähnliches YxC-Motiv (Spanu et al., 2010).

4.1.1 Nur Frühe MoHEGs werden *in planta* und *in vitro* exprimiert

Anhand der Expressionsprofile der *MoHEGs* während der Wirtinteraktion zwischen dem *M. oryzae* Isolat TH6772 und Gerste in Gerstenepidermis wurde deutlich, dass *MoHEGs* unter Berücksichtigung des Zeitpunktes der maximalen Transkriptabundanz, in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können: Frühe *MoHEGs* und Späte *MoHEGs* (3.1.3).

Das Transkriptionsmaximum der Frühen *MoHEGs* liegt zwischen 0 und 12 h p.i. (s. Abbildung 4). Zu diesen frühen Zeitpunkten der Entwicklung von *M. oryzae* befindet sich die Konidien auf der Oberfläche des Wirtes, keimen mit einem Keimschlauch aus und differenzieren am Ende dieses Keimschlauches ein Appressorium aus (Talbot, 2003; Kershaw and Talbot, 2009). In der Wirtinteraktion zwischen *M. oryzae* und Gerste sind zu 12 h p.i. bereits erste invasive Hyphen in den Epidermiszellen zu beobachten (Delventhal et al., 2014). Entsprechend kann für die Frühen *MoHEGs* eine Rolle während der frühen Pathogen-Wirt-Interaktion oder sogar in der Penetration und Etablierung invasiver Hyphen vermutet werden. Im Gegensatz dazu war die maximale Transkriptabundanz Später *MoHEGs* zu 24-48 h p.i. zu verzeichnen. Zu diesen Zeitpunkten befinden sich in der Wirtinteraktion die infektiösen Strukturen von *M. oryzae* bereits innerhalb der Pflanzenzelle, d.h. invasive Hyphen sind bereits ausgebildet und der Pilz ernährt sich von pflanzlichem Gewebe. Für die Späten *MoHEGs* kann daher eine Funktion in der Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktionsphase oder dem Übergang von biotropher zu nekrotropher Phase des Lebenszyklus vermutet werden.

In der vorliegenden Studie wurde die Expression der *MoHEGs* auch in *in vitro* gekeimten Konidien, also unabhängig von der Wirtspflanze, untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur Transkripte der Frühen *MoHEGs* hier detektiert werden konnten (s. Abbildung 5). Eine Ausnahme stellte dabei *MoHEG17* dar, das allerdings als einziges Frühes *MoHEG* sein Transkriptionsmaximum zu 12 h p.i. besitzt, während alle anderen Frühen *MoHEGs* maximal zwischen 0 und 6 h p.i. transkribiert sind. Für *MoHEG17* könnte entsprechend eine Funktion in der frühen biotrophen Interaktionsphase zwischen Pathogen und Wirt angenommen werden. Die Expression der *MoHEGs* scheint entsprechend vom Entwicklungsstadium des Pilzes abzuhängen, wobei die frühen Entwicklungsstadien, wie die Konidienkeimung, auch unabhängig von Anwesenheit der Wirtspflanze eine Expression der Frühen *MoHEGs* induziert. Darüber hinaus kann darüber spekuliert werden, ob die Expression der Späten *MoHEGs* zusätzlich von wirtsspezifischen Signalen stimuliert wird, die bei *in vitro* gekeimten Konidien nicht gegeben sind.

In einer 2006 (Gowda et al.) durchgeführten Studie wurden durch Microarrayexperimente, RL-SAGE- (engl. Robust-Long Serial Analysis of Gene Expression) und MPSS- (engl. Massively Parallel Signature Sequencing) Analysen die Transkriptome von in Flüssigkultur vegetativ wachsen-

dem Mycel und in Petrischalen keimenden und Appressorien bildenden Konidien verglichen. Diese beiden Situationen sind entsprechend, wie die hier durchgeführte *in vitro* Transkriptionsstudie, pflanzenunabhängig. Durch Recherchen in der zu der MPSS Analyse erstellten Datenbank (<http://mpss.udel.edu/mg/>) stellte sich heraus, dass auch die den Frühen *MoHEGs* zugeordneten Gene MGG_00737 (*MoHEG5*), MGG_09055 (*MoHEG7*) und MGG_01149 (*MoHEG16*) in dieser von Gowda et al. (2006) durchgeführten Studie exprimiert gefunden wurden. Späte *MoHEGs* wurden, mit Ausnahme von MGG_02239 (*MoHEG14*), nicht detektiert. Dieses Gen scheint entsprechend eine besondere Rolle innerhalb der Gruppe der Späten *MoHEGs* einzunehmen (vgl. auch 3.1.2). In dieser vorliegenden Arbeit konnte es zwar nicht in den *in vitro* Versuchen exprimiert gefunden werden (Abbildung 5), jedoch während der Interaktion mit Gerste konnten Transkripte von *MoHEG14* während aller analysierten Zeitpunkte, auch der sehr frühen, nachgewiesen werden (Abbildung 4). Der Vergleich mit dieser MPSS-Analyse bestätigt entsprechend einige auch in dieser Arbeit erhaltene Ergebnisse aus den *in vitro*-Expressionstudien, bei der die Frühen *MoHEGs* induziert, die Späten *MoHEGs* jedoch nicht induziert gefunden wurden.

In einer weiteren veröffentlichten Studie, in der Effektor Kandidaten des hemibiotrophen Ascomyceten *Colletotrichum higginsianum* identifiziert wurden, konnten ebenfalls früh, d.h. vor der Penetration, regulierte Kandidatengene für Effektoren gefunden werden (Kleemann et al., 2012). Diese, dort als Erste-Welle-Effektoren bezeichneten, Proteine werden allerdings nur bei Anwesenheit einer Wirtspflanze sekretiert, was sie deutlich von den Frühen *MoHEGs* unterscheidet.

4.1.2 *MoHEG16* ist ein Virulenzeffektor

Die in der vorliegenden Arbeit näher analysierten *MoHEGs* konnten unter Berücksichtigung des Transkriptionsprofils während der Infektion von Gerste in der biotrophen Interaktionsphase in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: Frühe und Späte *MoHEGs*. Bei frühen Zeitpunkten nach der Inokulation ist die Anzahl von Transkripten pilzlicher Gene in Ganzblattproben durch die noch geringe pilzliche Biomasse im Verhältnis zur Anzahl von Transkripten pflanzlicher Gene gering. Die Identifizierung der Frühen *MoHEGs* ist daher wahrscheinlich auf die Verwendung von Epidermisproben für das im Vorfeld durchgeführte Microarrayexperiment, zurückzuführen, in denen die Anzahl von Transkripten pflanzlicher Gene reduziert ist (siehe auch Delventhal, Dissertation, 2015). Effektorfunktion wurde noch für keines der Frühen *MoHEGs* oder andere früh exprimierte Effektoren in *M. oryzae* gezeigt, dagegen konnten einzelne Späte *MoHEGs* auch in anderen Studien identifiziert werden, in denen Ganzblattproben oder Blattscheiden verwendet wurden (s. Tabelle 5 und 4.1). Aus diesem Grund wurden zwei Gene der Frühen *MoHEGs* für

weitere Analysen ausgewählt. Auf Grund des Vorhandenseins des Y/F/WxC Motivs erschienen die Gene *MoHEG16* und *MoHEG18* besonders interessant.

Pilztransformanten, in denen das Gen *MoHEG16*, das neben der Y/F/WxC-Domäne noch eine konservierte CFEM Domäne besitzt, nicht mehr funktional vorliegt, zeigten einen abgeschwächten Infektionsverlauf nach 72 h p.i. im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (s. 3.2.2.2, Abbildung 10B). Diese Abschwächung äußerte sich durch signifikant weniger häufiges Eindringen der *Δmoheg16* Mutanten in die Wirtszellen und langsamere Kolonisierung des Mesophylls. Entsprechend ist der Verlust des Gens *MoHEG16* bei der Kolonisierung der Gerstensorte Vada ein Nachteil für *M. oryzae*. Der Verlust von *MoHEG16* verhindert jedoch die Kolonisierung des Wirtes nicht gänzlich. Das Pathogen ist auch nach Verlust des Gens noch in der Lage Blastsymptome auszubilden (s. Abbildung 10A). Das hier dargestellte Phänomen stellt ein Beispiel für einen Virulenzeffektor dar, das heißt, dass *MoHEG16* die Virulenz des Pathogens steigert. Es kann entsprechend vermutet werden, dass dieser Effektor das Immunsystem der Gerstenwirtszelle manipuliert, wodurch z.B. eine höhere Penetrationsfrequenz erreicht wird. Dies scheint nicht nur die Kolonisierung der ersten infizierten Zelle, sondern auch die Kolonisierung von Nachbargewebe (benachbarte Epidermis- oder Mesophyllzellen) zu betreffen, da ein Kollabieren hier signifikant weniger häufig zu beobachten war (s. Abbildung 10B). Auf Grund dieser Tatsachen lässt sich eine Rolle für *MoHEG16* in der frühen Besiedlung von primären oder sekundären Wirtszellen annehmen, was durch weitere Analysen, wie z.B. Lokalisationsanalysen zu Erforschen bleibt. Bislang sind nur wenige Virulenzeffektoren aus *M. oryzae* bekannt. *Slp1* (engl. Secreted LysM Protein 1) unterdrückt Chitin-induzierte Immunantworten durch Bindung von Chitinmonomeren, die dadurch nicht mehr durch den Reis-Chitinrezeptor CEBiP (engl. Chitin Elicitor Binding Protein) detektiert werden können (Mentlak et al., 2012). CEBiP induziert normalerweise Chitin-induzierte Abwehrreaktionen (Shimizu et al., 2010). *Δslp1* Mutanten zeigten eine reduzierte Virulenz auf Reisblattscheiben, indem Qualität und Quantität von Blastsymptomen reduziert wurden (Mentlak et al., 2012).

Die CFEM (engl. Common in several Fungal Extracellular Membrane proteins) Domäne (PFAM Domäne PF05730) ist eine EGF (engl. Epidermal Growth Factor)-ähnliche, Pilz-spezifische Domäne mit acht Cysteinresten und wurde besonders innerhalb des Proteoms von *M. oryzae* untersucht (Kulkarni et al., 2003). Sie kommt auch in einer Unterklasse pilzlicher GPCR (engl. G-Protein-Coupled Receptors)-ähnlicher Proteine vor, die entsprechend eine transmembrane Domäne besitzen können (Kulkarni et al., 2005). Ein Protein mit CFEM-Domäne ist beispielsweise PTH11, ein integrales Membranprotein, das für die Pathogenität des Pilzes von entscheidender Bedeutung ist (DeZwaan et al., 1999). Ein weiteres CFEM Protein ist ACI1 (MAC1 [*M. grisea* Ade-

nylate Cyclase]-Interacting Protein), das mit MAC1 (*M. grisea* Adenylate Cyclase) interagiert, wobei MAC1 in der Appressorienbildung eine Schlüsselrolle einnimmt und damit ebenfalls entscheidend für die Pathogenität ist (Kulkarni et al., 2003; Kulkarni and Dean, 2004). Für CFEM Proteine, die keine Transmembrandomäne besitzen, wird vermutet, dass sie mit GPCR-ähnlichen CFEM-Proteinen interagieren (Kulkarni et al., 2005). Für MoHEG16 wurde keine Transmembrandomäne vorhergesagt (@SoftBerry, Inc. [ProtComp v. 9.0], <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>), es könnte allerdings durch Interaktion mit einem GPCR-ähnlichen CFEM-Protein entsprechend an der Signaltransduktion für eine erfolgreiche Pathogenese beteiligt sein. Eine Studie über mögliche Interaktionspartner von MoHEG16 z.B. durch Yeast2Hybrid wäre daher sehr interessant. Darüber hinaus wurden integrale CFEM Proteine mit der basalen Immunantwort von *M. oryzae* gegen pathogenen Angriff von *Lysobacter enzymogenes* in Verbindung gebracht, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass Proteine, die eine solche Domäne besitzen in immunregulatorische Prozesse involviert sind (Mathioni et al., 2013).

Bei der Analyse von $\Delta moheg18$ Mutanten, wurde keine signifikante Abweichung des Infektionsphänotyps im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (3.2.3.2). Dies bedeutet allerdings nicht, dass eine Effektorfunktion für MoHEG18 generell auszuschließen wäre, da es sich hier um einen Effektor handeln könnte, der eine redundante Funktion zu anderen existierenden Effektorproteinen besitzt. Redundanzen innerhalb von Effektorrepertoiren sind sinnvoll, da die Manipulation von bestimmten Zielproteinen oder Signalwegen innerhalb der Wirtszelle von enormem Vorteil für ein Pathogen sein kann und diese so entsprechend durch mehrere Proteine mit redundanter Funktion abgesichert wird (1.4.1). Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Verlust von MoHEG18 durch einen anderen Effektor kompensiert werden kann.

Beide in dieser Arbeit untersuchten Gene, MoHEG16 und MoHEG18, kodieren für Proteine, die das Y/F/WxC Motiv besitzen, das in Effektoren des Echten Mehltaus (*Bgh*) und Haustorien bildenden Rostpilzen (*Pgt* bzw. *Pt*), die Wirtspflanzen innerhalb der Poaceae besitzen, eine Rolle zu spielen scheint (Godfrey et al., 2010). Dass Proteinen, die dieses Motiv besitzen, eine Rolle während der Pathogenese von *M. oryzae* mit Gerste zugeschrieben werden kann, ist durch die hier erhaltenen Ergebnisse nicht auszuschließen.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass in der vorliegenden Arbeit durch quantitative, mikroskopische Analyse ein neuer Virulenzeffektor von *M. oryzae* identifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu besitzen die meisten bekannten Effektoren dieses Pathogens Avirulenzfunktion (Valent and Khang, 2010). Bei Verlust von Avirulenzeffektoren, zeigt sich oft ein eindeutiger Infektionsphänotyp, da ein einzelner Avirulenzeffektor in Kombination mit einem einzelnen

Resistenzgen über Kompatibilität oder Inkompatibilität einer Interaktion entscheiden kann (s. 1.2).

4.1.3 Orthologe Gene der *MgHEGs* und *MoHEGs* sind ähnlich reguliert

In der vorliegenden Studie wurden zu 14 der 18 *MoHEGs*, die während der Wirtinteraktion zwischen dem *M. oryzae* Isolat TH6772 und Gerste differenziell reguliert sind, orthologe *MgHEGs* innerhalb des Genoms des *M. grisea* Isolates BR29 identifiziert (3.4.2). Entsprechend handelt es sich hier um einen Vergleich zwischen Genen verschiedener Arten innerhalb der Gattung *Pyricularia*. Beim individuellen Vergleich der Gensequenzen, stellte sich heraus, dass die Ähnlichkeit der Gene auf Nukleotidebene bei durchschnittlich 75,8 % liegt (s. Tabelle 6). Betrachtet man die Ähnlichkeiten der korrespondierenden Proteine mit und ohne Signalpeptid, fällt auf, dass zwischen beiden Proteinvarianten nur ein geringer Unterschied festzustellen ist (durchschnittlich 67,9 % und 66,3 %). Das deutet darauf hin, dass der Selektionsdruck gleichermaßen auf der Sequenz des Signalpeptids und auf der Sequenz des reifen Proteins liegt. In anderen Studien wurde im Gegensatz dazu eine höhere Aminosäurekonservierung innerhalb des Signalpeptid von Effektorkandidaten beobachtet (Catanzariti et al., 2006; Yoshida et al., 2009).

Bei Betrachtung der Expressionsprofile der *MgHEGs* während der kompatiblen Interaktion zwischen BR29 und der Gerstensorte Nigrate stellte sich heraus, dass *MgHEGs*, ähnlich der *MoHEGs*, ebenfalls in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden konnten: Frühe und Späte *MgHEGs* (s. Abbildung 22). Darüber hinaus war festzustellen, dass orthologe *MgHEGs* während einer kompatiblen Interaktion ähnlich induziert und reguliert sind wie *MoHEGs*. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den untersuchten Genen um echte funktionale Orthologe handeln könnte. Die ähnliche Expression orthologer HEG Effektoren innerhalb der Gattung *Pyricularia* könnte entsprechend auf einen konservierten Infektionsmechanismus zurückzuführen sein. Dies bleibt jedoch durch weitere funktionale Analysen von *MoHEGs* und *MgHEGs* zu bestätigen. Einen Hinweis auf eine etwas unterschiedliche Genregulierung war bei den Genen *MgHEG4* und *MgHEG14* festzustellen (3.4.2.2), obwohl sich zwischen den Genen *MgHEG14* und *MoHEG14* eine besonders hohe Ähnlichkeit von rund 90 % feststellen ließ. Das zeigt, dass auf Grund von großer Ähnlichkeit zwischen orthologen Genen nicht automatisch auch auf ähnliche Regulierung rückzuschließen ist. Bei Transkriptabundanzanalysen *in vitro* gekeimter BR29 Konidien wurde gezeigt, dass auch hier ausschließlich Transkripte der Frühen *MgHEGs* detektiert werden konnten (s. Abbildung 23). Eine Ausnahme stellt hier wiederum *MgHEG18* dar. Allerdings ist im Falle dieses Gens eine sehr geringe Homologie zwischen *MoHEG18* und *MgHEG18* zu verzeichnen (nur 15 % auf Ebene des reifen Proteins). Da *MgHEG18* während der kompatiblen Interaktion mit Nigrate jedoch

trotzdem früh reguliert war (s. Abbildung 22), könnte spekuliert werden, dass dieses Gen im Gegensatz zu den anderen Frühen *MgHEGs* nicht unabhängig von einer Wirtspflanze induziert ist.

Bis heute wurden in verschiedenen Studien mehrere Feldisolate innerhalb der Art *M. oryzae* resequenziert, wobei festgestellt werden konnte, dass jedes Isolat individuelle genomische Abschnitte besitzt (Yoshida et al., 2009; Xue et al., 2012; Chen et al., 2013a). Allerdings wurde in einer dieser Studien gezeigt, dass die Mehrheit der Gene innerhalb des gesamten Genoms (78 %) jedoch monomorphisch ist (Yoshida et al., 2009). Darüber hinaus konnte bei der Untersuchung von Polymorphismen sekretierter Proteine im öffentlich zugänglichen *M. oryzae* Genom und in 21 anderen Isolaten, gezeigt werden, dass die Menge an SNPs (engl. Single Nucleotide Polymorphisms) im Vergleich zu Genen, die generell an- oder abwesend sind, gering ausfällt (Yoshida et al., 2009). Damit zeigt *M. oryzae* im Vergleich zu anderen untersuchten Organismen weniger Sequenzpolymorphismen innerhalb einer Art (Mentlak et al., 2011). Dies ist wahrscheinlich auf die ausschließlich vegetative Vermehrung unter Feldbedingungen zurückzuführen. Generell an- oder abwesenden Gene scheinen daher mit Rassen-Sorten spezifischer Resistenz in Verbindung stehen, da diese sich im Verlauf der Co-Evolution von Pathogen und Wirt etablieren. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die zwischen MoHEGs und MgHEGs festgestellten Sequenzunterschiede auf unterschiedliche Funktionen zurückzuführen sind oder auf Unterschiede von Zielproteinen in den verschiedenen Wirtspflanzen.

4.2 MoNLP1, MoNLP2 und MoNLP4, sowie MgNLP1, MgNLP3 und MgNLP4, induzieren Zelltod in *N. benthamiana*

NLP Proteine kommen in verschiedenen phytopathogenen Organismen, wie Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien oder auch Pilzen und Oomyceten, vor (Gijzen and Nürnberger, 2006). Die bisher bekannte Funktion von NLPs ist die Induktion von Zelltod und von Ethylensynthese in zweikeimblättrigen Pflanzen (Bailey, 1995). Interessanterweise besitzt auch *M. oryzae* vier Gene, welche für NLPs kodieren (Gijzen and Nürnberger, 2006), obwohl nur einkeimblättrige Wirte für Pilze der Gattung *Pyricularia* bekannt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese vier MoNLPs auf ihre Fähigkeit hin analysiert werden, Zelltod in zweikeimblättrigen Pflanzen, wie *N. benthamiana*, zu induzieren, da sie für einen so genannten Zelltodassay (s. 4.2.1) verwendet werden sollten. Da Sequenzinformationen auch für die homologen Proteine aus dem *M. grisea* Isolat BR29 vorlagen, wurden diese ebenfalls auf die Fähigkeit der Nekroseinduktion untersucht. Alle in *M. oryzae* und *M. grisea* vorkommenden, im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten NLPs besitzen ein Signalpeptid.

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu MoNLPs wurde festgestellt, dass drei der vier bekannten MoNLPs eine Zelltod induzierende Wirkung in *N. benthamiana* besitzen: MoNLP1, MoNLP2 und MoNLP4 (s. Abbildung 15). Es wurde ebenfalls eine Zelltod induzierende Wirkung für MgNLP1, MgNLP3 und MgNLP4 festgestellt (s. Abbildung 24). MoNLP1 und MoNLP4, sowie MgNLP1 und MgNLP4, werden den Typ 1-NLPs und MoNLP2 bzw. MgNLP3 wiederum den Typ 2-NLPs zugeordnet. Die beiden Typen von NLPs unterscheiden sich in der Anzahl der konservierten Cysteinreste innerhalb der NPP1-Domäne, wobei die durch das erste Cysteinpaar, das in beiden NLP-Typen vorkommt, ausgebildete Disulfidbrücke für die Induktion der Nekrose von essenzieller Bedeutung zu sein scheint (Fellbrich et al., 2002; Cuesta Arenas et al., 2010). Die zweite, nur in Typ 2-NLPs vorkommende Disulfidbrücke, scheint allerdings nicht für die Nekroseinduktion von Nöten zu sein (Oome and Van den Ackerveken, 2014). Die Struktur der NLP-Proteine scheint ebenfalls eine besondere Rolle für die cytotoxische Aktivität der Proteine zu spielen, denn bei Analyse der Struktur von NLP_{pya} aus *Pythium aphanidermatum*, stellte sich heraus, dass diese cytolytischen Actinoporinen aus marinen Organismen wie der Seeanemone ähnlich ist (Ottmann et al., 2009). Ob NLPs in der Lage sind Zelltod zu induzieren scheint darüber hinaus zusätzlich von der Anwesenheit des Signalpeptids abzuhängen (Qutob et al., 2002; Qutob et al., 2006). Da die Zelltod induzierende Wirkung also von multiplen Faktoren abhängig zu sein scheint, ist es entsprechend nicht möglich, allein von der Aminosäuresequenz auf die Fähigkeit zur Nekroseinduktion zu schließen. Umso erstaunlicher ist es, dass *M. oryzae* überhaupt NLP Proteine mit Zelltod induzierender Wirkung besitzt, da diese Aktivität nur in zweikeimblättrigen Pflanzen zum Tragen kommt (Bailey, 1995). Es ist entsprechend zu vermuten, dass eine zusätzliche Funktion für NLPs existiert, wodurch auch eine Expression während der kompatiblen Interaktion erklärt werden könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem festgestellt werden, dass die Typ 1-NLPs *MoNLP1* und *MoNLP4* während der Interaktion zwischen *M. oryzae* und Gerste exprimiert werden (s. Abbildung 16). Die Expression von NLPs während der Pathogen-Wirt-Interaktion konnte auch in anderen Studien festgestellt werden. Beispielsweise bei den Oomyceten *P. infestans* und *H. arabidopsidis* (Kanneganti et al., 2006; Cabral et al., 2012) oder MpNEP2 aus dem Basidiomyceten *Moniliophthora perniciosa* (Zaparoли et al., 2011). Dabei sind erstere nicht cytotoxisch, letzteres jedoch besitzt Nekrose induzierende Fähigkeit. Auch das einzige NLP aus *Mycosphaerella graminicola* ist spezifisch während der Interaktion mit der einkeimblättrigen Wirtspflanze Weizen exprimiert (Motteram et al., 2009), obwohl, wie bereits erwähnt, NLPs keine cytotoxische Aktivität in einkeimblättrigen Pflanzen besitzen. Allerdings besaß die Knockout-Mutante dieses Gens keinen Virulenzphänotyp (Motteram et al., 2009). Die maximale Transkriptabundanz dieses NLPs ist allerdings wie bei *M. oryzae* (s. Abbildung 16) während der symptomfreien Phase zu

verzeichnen (Motteram et al., 2009). Ein weiteres Beispiel für ein solches Transkriptionsprofil ist das eines *NLPs* aus *Phytophthora sojae*, bei dem die Expression ebenfalls vor dem Übergang von biotropher zu nekrotrophe Phase des Lebenszyklus am stärksten ist (Qutob et al., 2002). Es kann entsprechend vermutet werden, dass *NLPs* auch ohne direkte cytotoxische Wirkung mit dem Übergang zu programmiertem Zelltod oder Nekrosen zu tun haben könnten. Diese genaue Funktion bleibt weiterhin zu untersuchen.

4.2.1 MoHEG13 unterdrückt den MoNLP-vermittelten Zelltod

Ist ein Pathogen von lebendem Gewebe abhängig, ist die Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen, wie dem programmierten Zelltod, eine wirkungsvolle Überlebenstrategie. Einen Hinweis auf eine Rolle von Effektorkandidaten in Bezug auf die Induktion oder Suppression von Zelltod kann durch transiente Zelltodassays erbracht werden, ohne dass eine zeitaufwändige funktionale Analyse mit stabilen Knockout-Transformanden nötig ist (Wang et al., 2011; Kleemann et al., 2012). So wurden beispielsweise die Effektoren Avr1b und Avh331 aus *P. sojae*, welche den BAX vermittelten Zelltod in Sojabohne, *N. benthamiana* und *S. cerevisiae* unterdrücken, durch einen Zelltodassay identifiziert (Dou et al., 2008b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Effektorkandidat ChEC3 aus *C. higginsianum*, den ChNLP1-vermittelten Zelltod in *N. benthamiana* unterdrückt (Kleemann et al., 2012). Hemibiotrophe Phytopathogene wie *M. oryzae* besitzen eine biotrophe und eine nekrotrophe Lebensphase innerhalb ihres Lebenszyklus. In der biotrophen Interaktionsphase muss programmierter Zelltod der Wirtzelle unterdrückt werden, um die Lebensgrundlage für das Pathogen zu sichern. Aus diesem Grund wurden die Frühen und Späten MoHEGs, die während der biotrophen Interaktionsphase zwischen Pathogen und Wirt ein Transkriptionsmaximum aufweisen, auf die Fähigkeit hin untersucht den NLP vermittelten Zelltod zu unterdrücken. Zu Beginn der nekrotrophen Phase muss im Gegensatz dazu Zelltod aktiv eingeleitet oder die Unterdrückung eines solchen entsprechend aufgehoben werden. Entsprechend wurden die Späten MoHEGs selbst auf eine Zelltod induzierende Wirkung analysiert.

In einer Studie, in der durch RL-SAGE, MPSS und SBS (engl. Sequencing By Synthesis) die kompatible und die inkompatible Interaktion von *M. oryzae* mit der Reissorte Nipponbare (Wildtyp oder Transformante mit kompatiblen R-Protein Pi9), verglichen wurde, wurden fünf zelltodauslösende Proteine, MoCDIPs (engl. *M. oryzae* Cell Death Inducing Proteins), identifiziert (Chen et al., 2013b). Die zu den MoCDIPs korrespondierenden Gene wurden allerdings nicht unter den analysierten MoHEGs oder den 157 im Vorfeld der vorliegenden Arbeit ermittelten, sekretierten Effektorkandidaten (3.1.1) gefunden. Darüber hinaus konnte für keines in dieser Arbeit analy-

siertes MoHEG selbst eine cytotoxische Wirkung gezeigt werden (3.3.2.2). Eine mögliche Begründung hierfür kann der unterschiedliche experimentelle Ansatz sein, den beide Studien unterscheiden. Denn in der Studie von Chen et al. (2013b) wurde das Transkriptom ganzer Blätter analysiert, wohingegen das Transkriptom inokulierter Epidermisproben die Grundlage für Effektorkandidaten in der vorliegenden Arbeit war.

Durch die Analyse der Zelltod induzierenden Eigenschaften der MoNLPs in *N. benthamiana*, konnten *Magnaporthe*-spezifische Zelltodinduktoren ermittelt werden (Abbildung 15), die in einem in dieser Arbeit angewendeten Zelltodassay verwendet werden konnten. Durch Co-Expression mit diesen zelltodinduzierenden MoNLPs, sollte die Zelltod supprimierende Wirkung der MoHEGs untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass MoHEG13 eine unterdrückende Wirkung auf den durch MoNLP1, MoNLP2 und MoNLP4 ausgelösten Zelltod besitzt (Abbildung 19). Damit besitzt MoHEG13 eine ähnliche Wirkung wie ChEC3, das diese Eigenschaften ebenfalls aufweist (Abbildung 15). Das deutet interessanterweise auf eine beiden Proteinen gemeinsame Funktion hin, die nicht spezifisch von einer Wirtspflanze abhängig ist, denn ChEC3 ist im Gegensatz zu MoHEG13 ein Effektor aus dem mit der Wirtspflanze *A. thaliana* assoziierten Pilz *C. higginsianum*. Da es sich bei MoNLP1 und MoNLP4 um Typ 1- und bei MoNLP2 um ein Typ 2-NLP handelt, scheinen ChEC3 und MoHEG13 den durch beide NLP-Typen vermittelten Zelltod zu unterdrücken. Da sowohl *MoNLP1*, *MoNLP4* und *MoHEG13* in *M. oryzae* während der Wirtinteraktion mit Gerste exprimiert werden (s. Abbildung 16 und Abbildung 4), kann über eine Interaktion dieser Proteine während der Pathogen-Wirt-Interaktion spekuliert werden. Da NLPs allerdings in einkeimblättrigen Pflanzen keine Nekrose induzieren, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass MoNLPs weitere, über die Cytotoxizität hinausgehende Funktionen besitzen, deren Unterdrückung für *M. oryzae* von Vorteil zu sein scheint. Weiterhin kann vermutet werden, dass MoHEG13 generell einen Einfluss auf Zelltodmechanismen innerhalb von Pflanzenzellen nimmt, d.h. Zelltodmechanismen unterdrückt. Für diese Spekulation wären allerdings weitere Experimente nötig, in denen der Einfluss von MoHEG13 auf durch andere Zelltodinduktoren, z.B. BAX (Dou et al., 2008b; Wang et al., 2011), vermittelte Zelltodprogramme getestet werden müsste. Über eine Rolle von MoHEG13 könnte bei einer solchen Annahme dahingehend spekuliert werden, dass das Protein vorzeitigen Zelltod der Wirtzelle verhindert um eine biotrophe Kolonisierung des Pilzes bis zum Übergang in die nekrotrophe Lebensphase zu gewährleisten.

MoHEG13 wurde bereits im Rahmen einer anderen Studie identifiziert und der Infektionsphänotyp von Deletionsmutanten in einer groß angelegten Screening Analyse nach der Inokulation von Reis makroskopisch bestimmt (Saitoh et al., 2012). Dabei wurde allerdings kein signifikanter Unterschied des Infektionsphänotyps im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. In der im Rahmen

dieser Arbeit verfassten Veröffentlichung wurde allerdings durch die mikroskopische Analyse einer *Δmoheg13* Mutante während der Wirtinteraktion mit der Gerstensorte Vada gezeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp, der Verlust des Gens die Anzahl der Rice-Blast-Symptome reduziert und die Penetrationsrate zu 24 h p.i. geringer ist (Mogga et al., 2016). *MoHEG13* ist entsprechend, wie *MoHEG16*, ein Effektor mit Virulenzeigenschaften, dessen Verlust für das Pathogen ein Nachteil zu sein scheint. Es bleibt durch weitere Versuche zu analysieren, ob diese Virulenzfunktion mit der Zelltod supprimierenden Eigenschaft verknüpft ist.

4.3 MoNUDIX fördert die Virulenz von *M. oryzae* in Gerste

NUDIX (engl. NUCleoside Diphosphate linked to X) Hydrolasen können in nahezu allen Klassen der Organismen gefunden werden, sogar in Viren und Archaea (Mildvan et al., 2005). Sie katalysieren die Hydrolyse einer ganzen Reihe von organischen Pyrophosphaten, wie Nucleosiddiphosphat oder Nucleosidtriphosphat, NADH, Coenzym A und vielen anderen und besitzen damit mannigfaltige Funktionen (Mildvan et al., 2005; McLennan, 2006). NUDIX Hydrolasen besitzen ein charakteristisches Motiv, Gx₅Ex₅[UA]xREx₂EExGU, (U ist hier eine aliphatische, hydrophobe Aminosäure), die so genannte NUDIX Box, welche für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell ist.

Eine besondere Rolle scheint sekretierten NUDIX-Hydrolasen in hemibiotrophen, pilzlichen und pilz-ähnlichen Phytopathogenen zuzukommen (Bhadauria et al., 2013). Eine solche Rolle als Effektor oder Pathogenitätsfaktor sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für MoNUDIX, die NUDIX-Hydrolase aus *M. oryzae* untersucht werden.

Zunächst wurden die Proteinsequenzen von NUDIX-Hydrolasen innerhalb der Gattung *Pyricularia* einer phylogenetischen Analyse unterzogen (3.5.1). Dabei stellte sich heraus, dass die NUDIX-Hydrolasen der *M. oryzae* Reisisolate FR13, Guy11, TH12, TH16 und PH14 in einer Gruppe zusammengefasst werden können. Ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet werden jeweils eine NUDIX-Hydrolase der Isolate US71 und CD156, die mit den Wirtspflanzen *Setaria* bzw. *Eleusine* assoziiert sind. Diese Isolate besitzen jeweils zwei divergente *NUDIX*-Gene, wobei das zweite Gen jeweils einer anderen Gruppe zugeordnet wird, zu der ebenfalls ein *NUDIX*-Gen des *M. grisea* Isolats BR29 zu zählen ist. Interessanterweise wird ein zweites *NUDIX*-Gen aus BR29 in eine Gruppe mit den NUDIX-Hydrolasen aus *C. truncatum* und *C. graminicola* eingeordnet. Schließt man von diesen Ergebnissen auf eine phylogenetische Verwandtschaft der Isolate, wären das *Eleusine*-Isolat und das *Setaria*-Isolat näher mit den Reisisolaten verwandt als das *Digitaria*-Isolat. Dies ist im Fall des *Eleusine*-Isolats CD156 auch bestätigt, denn es wird, im Gegensatz zu BR29, wie die Reisisolate zu der Art *M. oryzae* zugeordnet (Klaubauf et al., 2014). BR29

dagegen zählt zu der Art *M. grisea* (Zellerhoff et al., 2006; Klaubauf et al., 2014). Die taxonomische Einordnung des *Setaria*-Isolats US71 muss noch durch weitere phylogenetische Untersuchungen anderer Genloci analysiert werden.

Eine Transkriptionsanalyse zeigte weiterhin, dass *MoNUDIX* aus *M. oryzae* und *BR29NUDIX* aus *M. grisea* während der kompatiblen Interaktion mit Gerste bzw. *Digitaria* induziert sind (Abbildung 26). Beide Gene werden unmittelbar vor dem BNS maximal exprimiert, womit sie ein ähnliches Expressionsprofil wie *CtNUDIX* aus *C. truncatum* aufweisen (Bhadauria et al., 2013).

Durch Überexpression des Gens, das für MoNUDIX kodiert und beider paraloger MoNUDIX-Gene entspricht, stellte sich bei der mikroskopischen Analyse heraus, dass das Wachstum von biotrophen invasiven Hyphen positiv beeinflusst wird. Es waren zu 48 h p.i. häufiger biotrophe invasive Hyphen in Gerstenepidermiszellen von Überexpressionsmutanten zu beobachten als im korrespondierenden Wildtyp. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Abbildung 33A). Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus eine Silencingmutante generiert werden, bei der eine Expressionsanalyse eine vollständige Reduktion von Transkripten beider in Isolat 70-15 für MoNUDIX kodierender Gene ergab (siNUDIX-1.1, s. Abbildung 28). Bei dieser Mutante zeigte sich ein sehr prägnanter Phänotyp auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene (Abbildung 31 und Abbildung 33B). Diese Mutante war nicht mehr in der Lage invasive Hyphen auszubilden und somit Blastsymptome zu verursachen. Unglücklicherweise konnte dies nicht durch eine zweite unabhängige Mutante bestätigt werden. In weiteren Experimenten wäre es sinnvoll eine Deletionsmutante im Hintergrund des *M. oryzae* Isolats Guy11 zu generieren, die nur eine Kopie des Gens *MoNUDIX* besitzt, um diesen interessanten Phänotyp zu verifizieren. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine Funktion von MoNUDIX hin, die das Wachstum invasiver Hyphen beeinflusst. Die Überexpression des Gens fördert dieses Wachstum, der Verlust des Gens verhindert es entsprechend. Desweiteren ist über eine Rolle von MoNUDIX während des Übergangs von biotropher zu nekrotropher Phase zu spekulieren, da die maximale Transkriptabundanz kurz vor dieser Phase des Lebenszyklus zu beobachten ist. Auf das vegetative Wachstum in Kultur hat eine Überexpression oder Herunter-Regulation von *MoNUDIX* allerdings keinen Einfluss (Abbildung 29). Die Funktion scheint somit nur *in planta* während der Pathogen-Wirt-Interaktion wichtig zu sein. Durch den positiven Einfluss von MoNUDIX auf die Virulenz von *M. oryzae* kann dieses Protein auch als Pathogenitätsfaktor oder auch VIR-Effektor bezeichnet werden.

Das Gen *CtNUDIX* wurde ebenfalls mit dem BNS und dem invasiven Hyphen-Wachstum in Verbindung gebracht, da *CtNUDIX* einen HR-ähnlichen Zelltod in *N. tabacum* induziert und das korrespondierende Gen kurz vor dem BNS maximal transkribiert wird (Bhadauria et al., 2013). Al-

lerdings wurde für MoNUDIX eine solche Fähigkeit weder in *N. tabacum* noch in *N. benthamiana* festgestellt (Abbildung 34). Darüber hinaus konnten Überexpressionsmutanten von *CtNUDIX* keine sekundären, invasiven Hyphen in den Nachbarzellen ausbilden (Bhadauria et al., 2013). Die Überexpression von *MoNUDIX* förderte das invasive Hyphen-Wachstum dagegen, Silencing des Gens verhinderte es gänzlich (Abbildung 33). Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass MoNUDIX nicht die gleichen Funktionen zu haben scheint wie CtNUDIX, allerdings haben beide Proteine ein ähnliches Expressionsprofil und einen Einfluss auf das Wachstum invasiver Hyphen.

In einer weiteren Studie konnte ebenfalls ein Effektor mit NUDIX Motiv identifiziert werden, dessen Funktion mit der Virulenz des Pathogens in Verbindung zu bringen ist (Dong et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass der apoplastische AVR-Effektor Avr3b aus *Phytophthora sojae* die ETI unterdrückt, denn es wurde ausschließlich eine erhöhte Biomasse von Wildtyp *P. sojae* mit enzymatisch aktivem Avr3b in infizierten Sojabohnen detektiert (Dong et al., 2011). Avr3b weist ATP-Ribose und NADH Pyrophosphatase Aktivität auf, weswegen vermutet wurde, dass dieser Effektor die Akkumulation pathogen-induzierter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, engl. Reactive Oxygen Species) unterdrückt (Dong et al., 2011). In *Arabidopsis thaliana* führte die Deletion des NUDIX Hydrolase Gens *AtNUDT7* zu erhöhter Resistenz gegen *P. syringae* und *H. arabidopsidis* (Bartsch et al., 2006). Aus diesem Grund wird vermutet, dass ADP-Ribose/NADH Pyrophosphatasen als negative Regulatoren der Pflanzenabwehr fungieren können und Pathogene die Pflanzenabwehr ebenfalls zu unterdrücken versuchen, indem sie Effektoren wie Avr3b mit ähnlicher Funktion etablieren, die diese negative Regulation nachahmen können (Dong et al., 2011). Da die Überexpression von *MoNUDIX* die Pflanzenabwehr ebenfalls herabzusetzen scheint, wie durch vermehrtes invasives Hyphenwachstum deutlich wird, wäre interessant zu untersuchen, ob *M. oryzae* während der Interaktion mit Gerste durch Überexpression von *MoNUDIX* die Gerstenabwehr ebenfalls negativ reguliert.

4.4 Fazit

Während der Interaktion zwischen Pilzen der Gattung *Magnaporthe* und Gerste wird die Expression von Genen induziert, die für putativ sekretierte Proteine kodieren. Innerhalb dieses Effektorrepertoires befinden sich, vor allem in der Wirtinteraktion, solche Proteine, die die Wirtabwehr manipulieren können und die Virulenz des Pathogens fördern. MoHEG16 und MoNUDIX sind Beispiele für solche Virulenzeffektoren. Durch den Verlust von MoHEG16 und MoNUDIX wird die Virulenz von *M. oryzae* abgeschwächt, indem das Wachstum invasiver Hyphen verrin-

gert wird und wodurch die Kolonisierung des Wirtes schwächer ausfällt. Der Verlust dieser Virulenzeffektoren führt allerdings nicht zur vollständigen Inkompatibilität mit dem Wirt. Entsprechend kann spekuliert werden, dass die maximale Virulenz eines Pathogens durch das additive Wirken mehrerer Virulenzeffektoren des Effektorrepertoires bedingt wird.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich innerhalb des Effektorrepertoires von *M. oryzae* Gene befinden, die für Proteine kodieren, welche Zelltod in zweikeimblättrigen Pflanzen induzieren: MoNLP1 und MoNLP4. Diese Zelltod induzierende Wirkung kann wiederum durch eine andere Komponente innerhalb des Repertoires aufgehoben oder gehemmt werden. So unterdrückt MoHEG13 die Zelltod induzierende Wirkung von MoNLP1 und MoNLP4 in *N. benthamiana*. Zusätzlich wird ebenfalls die Zelltod induzierende Wirkung von MoNLP2 durch MoHEG13 supprimiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Einzelkomponenten des Effektorrepertoires direkt oder indirekt miteinander interagieren und ihre Wirkung gegenseitig beeinflussen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass an der Pathogenese von *Magnaporthe* auf Gerste sowohl Effektoren mit einem quantitativen Effekt auf die Virulenz des Pathogens als auch komplizierte Wechselwirkungen zwischen Effektoren beteiligt sind. Die funktionale Analyse einzelner Virulenzeffektoren kann daher in den meisten Fällen nicht nur durch makroskopische Bonitur erfolgen. Die Identifizierung aller Virulenz bedingender Faktoren bedarf dementsprechend sensitiver Studien, wie der intensiven mikroskopischen Analyse, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Afzal, A.J., da Cunha, L., and Mackey, D. 2011. Separable fragments and membrane tethering of *Arabidopsis* RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *Plant Cell* 23:3798-3811.
- Aist, J.R. 1976. Papillae and Related Wound Plugs of Plant Cells. *Annual Review of Phytopathology* 14:145-163.
- Bailey, B.A. 1995. Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* 85:1250-1255.
- Bailey, B.A., Dean, J.F., and Anderson, J.D. 1990. An Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase Elicits Electrolyte Leakage and Necrosis in *Nicotiana tabacum* cv Xanthi Leaves. *Plant Physiology* 94:1849-1854.
- Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J.L., Bautor, J., and Parker, J.E. 2006. Salicylic Acid-Independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Signaling in *Arabidopsis* Immunity and Cell Death Is Regulated by the Monooxygenase *FMO1* and the Nudix Hydrolase *NUDT7*. *The Plant Cell* 18:1038-1051.
- Bessman, M.J., Frick, D.N., and O'Handley, S.F. 1996. The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *The Journal of biological chemistry* 271:25059-25062.
- Bhadauria, V., Banniza, S., Vandenberg, A., Selvaraj, G., and Wei, Y. 2013. Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. *Eukaryotic cell* 12:2-11.
- Birch, P.R.J., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Hein, I., Pritchard, L., and Whisson, S.C. 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 11:373-379.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326:1509-1512.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual review of plant biology* 60:379-406.
- Bozhkov, P.V., and Lam, E. 2011. Green death: revealing programmed cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* 18:1239-1240.
- Bruno, K.S., Tenjo, F., Li, L., Hamer, J.E., and Xu, J.R. 2004. Cellular localization and role of kinase activity of PMK1 in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryotic cell* 3:1525-1532.
- Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R., and Valent, B. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2033-2046.
- Cabral, A., Oome, S., Sander, N., Küfner, I., Nürnberger, T., and Van den Ackerveken, G. 2012. Nontoxic Nep1-Like Proteins of the Downy Mildew Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*: Repression of Necrosis-Inducing Activity by a Surface-Exposed Region. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:697-708.
- Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A., and Ellis, J.G. 2006. Haustorially Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18:243-256.
- Catlett, N.L., Lee, B.-N., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. 2003. Split-Marker Recombination for Efficient Targeted Deletion of Fungal Genes *Fungal Genetic Newsletters* 50:9-11.
- Césari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., Morel, J.-B., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R., and Kroj, T. 2013. The Rice

- Resistance Protein Pair RGA4/RGA5 Recognizes the *Magnaporthe oryzae* Effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by Direct Binding. *Plant Cell* 25:1463-1481.
- Chen, C., Lian, B., Hu, J., Zhai, H., Wang, X., Venu, R.C., Liu, E., Wang, Z., Chen, M., Wang, B., Wang, G.L., Wang, Z., and Mitchell, T.K. 2013a. Genome comparison of two *Magnaporthe oryzae* field isolates reveals genome variations and potential virulence effectors. *BMC genomics* 14:887.
- Chen, S., Songkumarn, P., Venu, R.C., Gowda, M., Bellizzi, M., Hu, J., Liu, W., Ebbole, D., Meyers, B., Mitchell, T., and Wang, G.L. 2013b. Identification and characterization of in planta-expressed secreted effector proteins from *Magnaporthe oryzae* that induce cell death in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:191-202.
- Couch, B.C., and Kohn, L.M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94:683-693.
- Couch, B.C., Fudal, I., Lebrun, M.-H., Tharreau, D., Valent, B., van Kim, P., Nottéghem, J.-L., and Kohn, L.M. 2005. Origins of Host-Specific Populations of the Blast Pathogen *Magnaporthe oryzae* in Crop Domestication With Subsequent Expansion of Pandemic Clones on Rice and Weeds of Rice. *Genetics* 170:613-630.
- Cuesta Arenas, Y., Kalkman, E.R.I.C., Schouten, A., Dieho, M., Vredenburg, P., Uwumukiza, B., Osés Ruiz, M., and Kan, J.A.L.v. 2010. Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74:376-386.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., and Thomma, B.P. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329:953-955.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H.Q., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W.X., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., and Birren, B.W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980-986.
- Delventhal, R., Falter, C., Strugala, R., Zellerhoff, N., and Schaffrath, U. 2014. Ectoparasitic growth of *Magnaporthe* on barley triggers expression of the putative barley wax biosynthesis gene CYP96B22 which is involved in penetration resistance. *Bmc Plant Biol* 14:26.
- Deslandes, L., and Rivas, S. 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends In Plant Science* 17:644-655.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B., and Sweigard, J.A. 1999. *Magnaporthe grisea* Pth11p Is a Novel Plasma Membrane Protein That Mediates Appressorium Differentiation in Response to Inductive Substrate Cues. *The Plant Cell* 11:2013-2030.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., and Kahmann, R. 2011. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478:395-398.
- Dong, S., Yin, W., Kong, G., Yang, X., Qutob, D., Chen, Q., Kale, S.D., Sui, Y., Zhang, Z., Dou, D., Zheng, X., Gijzen, M., Tyler, B.M., and Wang, Y. 2011. *Phytophthora sojae* avirulence effector Avr3b is a secreted NADH and ADP-ribose pyrophosphorylase that modulates plant immunity. *PLoS pathogens* 7:e1002353.

- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H.Y., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X., and Tyler, B.M. 2008a. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20:1930-1947.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Wang, X., Jiang, R.H.Y., Arredondo, F.D., Anderson, R.G., Thakur, P.B., McDowell, J.M., Wang, Y., and Tyler, B.M. 2008b. Conserved C-Terminal Motifs Required for Avirulence and Suppression of Cell Death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell* 20:1118-1133.
- Dudler, R., and Hertig, C. 1992. Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications. *The Journal of biological chemistry* 267:5882-5888.
- Ebbole, D.J. 2007. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 45:437-456.
- Faivre-Rampant, O., Thomas, J., Allegre, M., Morel, J.B., Tharreau, D., Notteghem, J.L., Lebrun, M.H., Schaffrath, U., and Piffanelli, P. 2008. Characterization of the model system rice-*Magnaporthe* for the study of nonhost resistance in cereals. *New Phytologist* 180:899-910.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., and Nürnberger, T. 2002. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32:375-390.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484:186-194.
- Flor, H.H. 1971. Current Status of Gene-for-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., and Wagner, S. 2014. Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells. *Annual Review of Microbiology* 68:415-438.
- Gijzen, M., and Nürnberger, T. 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* 67:1800-1807.
- Giraldo, M.C., and Valent, B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Review Microbiology* 11:800-814.
- Giraldo, M.C., Dagdas, Y.F., Gupta, Y.K., Mentlak, T.A., Yi, M., Martinez-Rocha, A.L., Saitoh, H., Terauchi, R., Talbot, N.J., and Valent, B. 2013. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature Communication* 4:1996.
- Godfrey, D., Bohlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC genomics* 11:317.
- Göhre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., and Robatzek, S. 2008. Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current Biology* 18:1824-1832.
- Gowda, M., Venu, R.C., Raghupathy, M.B., Nobuta, K., Li, H., Wing, R., Stahlberg, E., Coughlan, S., Haudenschild, C.D., Dean, R., Nahm, B.H., Meyers, B.C., and Wang, G.L. 2006. Deep and comparative analysis of the mycelium and appressorium transcriptomes of *Magnaporthe grisea* using MPSS, RL-SAGE, and oligoarray methods. *BMC genomics* 7:310.
- Green, D.R. 1998. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94:695-698.
- Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G., and Valent, B. 1988. A Mechanism for Surface Attachment in Spores of a Plant Pathogenic Fungus. *Science* 239:288-290.
- Heath, M.C. 2000a. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Heath, M.C. 2000b. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- Heath, M.C. 2001. Non-host resistance to plant pathogens: Nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58:53-54.

- Heath, M.C. 2002. Cellular interactions between biotrophic fungal pathogens and host or nonhost plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:259-264.
- Hogenhout, S.A., Van der Hoorn, R.A.L., Terauchi, R., and Kamoun, S. 2009. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:115-122.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., and Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research* 35:W585-W587.
- Hückelhoven, R. 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45:101-127.
- Hyon, G.-S., Nga, N., Chuma, I., Inoue, Y., Asano, H., Murata, N., Kusaba, M., and Tosa, Y. 2012. Characterization of interactions between barley and various host-specific subgroups of *Magnaporthe oryzae* and *M. grisea*. *Journal of General Plant Pathology* 78:237-246.
- Jansen, M., Slusarenko, A.J., and Schaffrath, U. 2006. Competence of roots for race-specific resistance and the induction of acquired resistance against *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology* 7:191-195.
- Jarosch, B., Kogel, K.-H., and Schaffrath, U. 1999. The Ambivalence of the Barley Mlo Locus: Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:508-514.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo Journal* 19:4004-4014.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. 2003. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:769-776.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. 2004. One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation. *The Journal of biological chemistry* 279:44467-44474.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11086-11091.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C.B., Shan, W., and Tyler, B.M. 2010. External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* 142:284-295.
- Kang, S., Sweigard, J.A., and Valent, B. 1995. The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:939-948.
- Kankanala, P., Czymmek, K., and Valent, B. 2007. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* 19:706-724.
- Kanneganti, T.-D., Huitema, E., Cakir, C., and Kamoun, S. 2006. Synergistic Interactions of the Plant Cell Death Pathways Induced by *Phytophthora infestans* Nep1-Like Protein PiNPP1.1 and INF1 Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:854-863.
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., and Terauchi, R. 2012. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal* 72:894-907.
- Kato, H., Yamamoto, M., Yamaguchi-Ozaki, T., Kadouchi, H., Iwamoto, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S., and Mori, N. 2000. Pathogenicity, Mating Ability and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms of *Pyricularia* Populations Isolated from *Gramineae*, *Bambusideae* and *Zingiberaceae* Plants. *Journal of General Plant Pathology* 66:30-47.

- Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R.T. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1130-1139.
- Kershaw, M.J., and Talbot, N.J. 2009. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:15967-15972.
- Khang, C.H., Berruyer, R., Giraldo, M.C., Kankanala, P., Park, S.Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* 22:1388-1403.
- Khush, G.S. 2005. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol* 59:1-6.
- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L. 2005a. The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:6496-6501.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. 2005b. Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* 121:749-759.
- Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., de Vries, R.P., and Lebrun, M.H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (*Pyriculariaceae*). *Studies in Mycology* 79:85-120.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E.V.L., van der Does, H.C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., and O'Connell, R.J. 2012. Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS pathogens* 8:e1002643.
- Koga, H. 1994. Hypersensitive death, autofluorescence, and ultrastructural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near-isogenic lines of rice ($Pi-z^1$) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. *Canadian Journal of Botany* 72:1463-1477.
- Kraszewska, E. 2008. The plant Nudix hydrolase family. *Acta Biochimica Polonica* 55:663-671.
- Kulkarni, R.D., and Dean, R.A. 2004. Identification of proteins that interact with two regulators of appressorium development, adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase A, in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Genetics and Genomics* 270:497-508.
- Kulkarni, R.D., Kelkar, H.S., and Dean, R.A. 2003. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 28:118-121.
- Kulkarni, R.D., Thon, M.R., Pan, H., and Dean, R.A. 2005. Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome biology* 6:R24.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402-408.
- Loehrer, M., Botterweck, J., Jahnke, J., Mahlmann, D.M., Gaetgens, J., Oldiges, M., Horbach, R., Deising, H., and Schaffrath, U. 2014. *In vivo* assessment by Mach-Zehnder double-beam interferometry of the invasive force exerted by the Asian soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi*). *New Phytologist* 203:620-631.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:183-193.
- Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P.M., Kang, S., Shim, W.-B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J.-R., Antoniw, J., Baker, S.E., Bluhm, B.H., Breakspear, A., Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Diener, A., Gale, L.R., Gardiner, D.M., Goff, S., Hammond-Kosack, K.E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C.D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y.-H., Li, L., Manners, J.M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S.-Y., Proctor, R.H., Regev, A., Ruiz-

- Roldan, M.C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D.C., Turgeon, B.G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C.A., Kistler, H.C., and Rep, M. 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464:367-373.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A., and Dangl, J.L. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754.
- Mathioni, S.M., Belo, A., Rizzo, C.J., Dean, R.A., and Donofrio, N.M. 2011. Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and *in vitro* stresses. *BMC genomics* 12:49.
- Mathioni, S.M., Patel, N., Riddick, B., Sweigard, J.A., Czymmek, K.J., Caplan, J.L., Kunjeti, S.G., Kunjeti, S., Raman, V., Hillman, B.I., Kobayashi, D.Y., and Donofrio, N.M. 2013. Transcriptomics of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in response to the bacterial antagonist *Lysobacter enzymogenes* reveals candidate fungal defense response genes. *PLoS One* 8:e76487.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mae, A., and Pirhonen, M. 2004. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:1366-1375.
- McLennan, A.G. 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and molecular life sciences* 63:123-143.
- Mentlak, T.A., Talbot, N.J., and Kroj, T. 2011. Effector Translocation and Delivery by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. Pages 219-241 in: *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, Wiley-Blackwell.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P., and Talbot, N.J. 2012. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* 24:322-335.
- Mildvan, A.S., Xia, Z., Azurmendi, H.F., Saraswat, V., Legler, P.M., Massiah, M.A., Gabelli, S.B., Bianchet, M.A., Kang, L.W., and Amzel, L.M. 2005. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433:129-143.
- Mogga, V., Delventhal, R., Weidenbach, D., Langer, S., Bertram, P.M., Andresen, K., Thines, E., Kroj, T., and Schaffrath, U. 2016. *Magnaporthe oryzae* effectors MoHEG13 and MoHEG16 interfere with host infection and MoHEG13 counteracts cell death caused by *Magnaporthe*-NLPs in tobacco. *Plant Cell Rep* 35:1169-1185.
- Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326:1501.
- Mosquera, G., Giraldo, M.C., Khang, C.H., Coughlan, S., and Valent, B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as Biotrophy-Associated Secreted Proteins in Rice Blast Disease. *Plant Cell* 21:1273-1290.
- Motteram, J., Küfner, I., Deller, S., Brunner, F., Hammond-Kosack, K.E., Nürnberger, T., and Rudd, J.J. 2009. Molecular Characterization and Functional Analysis of MgNLP, the Sole NPP1 Domain Containing Protein, from the Fungal Wheat Leaf Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:790-799.
- Mukhtar, M.S., Carvunis, A.R., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., Pevzner, S.J., Donovan, S.E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M.M., Gebreab, F., Gutierrez, B.J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C.J., McDonald, N., Gai, L., Chen, H., He, Y., Vandenhaute, J., Roth, F.P., Hill, D.E., Ecker, J.R., Vidal, M., Beynon, J., Braun, P., and Dangl, J.L. 2011. Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333:596-601.
- Mülhardt, C. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Springer Spektrum.

- Mysore, K.S., and Ryu, C.M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* 9:97-104.
- Nguyen, Q.B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S., and Nakayashiki, H. 2008. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Molecular microbiology* 68:1348-1365.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198:249-266.
- Oh, H.S., Tosa, Y., Takabayashi, N., Nakagawa, S., Tomita, R., Don, L.D., Kusaba, M., Nakayashiki, H., and Mayama, S. 2002. Characterization of an *Avena* isolate of *Magnaporthe grisea* and identification of a locus conditioning its specificity on oat. *Canadian Journal of Botany* 80:1088-1095.
- Oome, S., and Van den Ackerveken, G. 2014. Comparative and Functional Analysis of the Widely Occurring Family of Nep1-Like Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:1081-1094.
- Ottmann, C., Luberacki, B., Kufner, I., Koch, W., Brunner, F., Weyand, M., Mattinen, L., Pirhonen, M., Anderluh, G., Seitz, H.U., Nürnbergger, T., and Oecking, C. 2009. A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10359-10364.
- Ou, S.H., ed. 1985. *Rice Diseases*. Commonwealth Mycological Institute.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8:785-786.
- Qutob, D., Kamoun, S., and Gijzen, M. 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal* 32:361-373.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Luberacki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M., and Nürnbergger, T. 2006. Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *Plant Cell* 18:3721-3744.
- Raffaele, S., Farrer, R.A., Cano, L.M., Studholme, D.J., MacLean, D., Thines, M., Jiang, R.H., Zody, M.C., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Meyers, B.C., Nusbaum, C., and Kamoun, S. 2010. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science* 330:1540-1543.
- Rafiqi, M., Gan, P.H., Ravensdale, M., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R., and Dodds, P.N. 2010. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* 22:2017-2032.
- Ribot, C., Cesari, S., Abidi, I., Chalvon, V., Bournaud, C., Vallet, J., Lebrun, M.H., Morel, J.B., and Kroj, T. 2013. The *Magnaporthe oryzae* effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. *Plant Journal* 74:1-12.
- Roy, B.A. 2001. Patterns of association between crucifers and their flower-mimic pathogens: host jumps are more common than coevolution or cospeciation. *Evolution* 55:41-53.
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., Irieda, H., Yoshino, K., Yoshida, K., Matsumura, H., Tosa, Y., Win, J., Kamoun, S., Takano, Y., and Terauchi, R. 2012. Large-Scale Gene Disruption in *Magnaporthe oryzae* Identifies MC69, a Secreted Protein Required for Infection by Monocot and Dicot Fungal Pathogens. *PLoS pathogens* 8:e1002711.
- Santhanam, P., van Esse, H.P., Albert, I., Faino, L., Nürnbergger, T., and Thomma, B.P.H.J. 2013. Evidence for Functional Diversification Within a Fungal NEP1-Like Protein Family. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:278-286.
- Scholze, H., and Boch, J. 2010. TAL effector-DNA specificity. *Virulence* 1:428-432.

- Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R. 2011. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science* 16:117-125.
- Sesma, A., and Osbourn, A.E. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431:582-586.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., and Shibuya, N. 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant Journal* 64:204-214.
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., and Vorobyev, D. 2006. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome biology* 7 Suppl 1:S10 11-12.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517.
- Spanu, P.D., Abbott, J.C., Amselem, J., Burgis, T.A., Soanes, D.M., Stuber, K., Ver Loren van Themaat, E., Brown, J.K., Butcher, S.A., Gurr, S.J., Lebrun, M.H., Ridout, C.J., Schulze-Lefert, P., Talbot, N.J., Ahmadinejad, N., Ametz, C., Barton, G.R., Benjdia, M., Bidzinski, P., Bindschedler, L.V., Both, M., Brewer, M.T., Cadle-Davidson, L., Cadle-Davidson, M.M., Collemare, J., Cramer, R., Frenkel, O., Godfrey, D., Harriman, J., Hoede, C., King, B.C., Klages, S., Kleemann, J., Knoll, D., Koti, P.S., Kreplak, J., Lopez-Ruiz, F.J., Lu, X., Maekawa, T., Mahanil, S., Micali, C., Milgroom, M.G., Montana, G., Noir, S., O'Connell, R.J., Oberhaensli, S., Parlange, F., Pedersen, C., Quesneville, H., Reinhardt, R., Rott, M., Sacristan, S., Schmidt, S.M., Schon, M., Skamnioti, P., Sommer, H., Stephens, A., Takahara, H., Thordal-Christensen, H., Vigouroux, M., Wessling, R., Wicker, T., and Panstruga, R. 2010. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science* 330:1543-1546.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P.J. 2009. Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47:233-263.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B. 1995. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *The Plant Cell* 7:1221-1233.
- Talbot, N.J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 57:177-202.
- Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6:351-357.
- Tosa, Y., Tamba, H., Tanaka, K., and Mayama, S. 2006. Genetic Analysis of Host Species Specificity of *Magnaporthe oryzae* Isolates from Rice and Wheat. *Phytopathology* 96:480-484.
- Tosa, Y., Osue, J., Eto, Y., Oh, H.-S., Nakayashiki, H., Mayama, S., and Leong, S.A. 2005. Evolution of an Avirulence Gene, *AVR1-CO39*, Concomitant with the Evolution and Differentiation of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:1148-1160.
- Tsuda, K., and Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13:459-465.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H.Y., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M.B., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grunwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M.-K., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J.G., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K.C., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W.S., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S., and Boore, J.L. 2006. *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* 313:1261-1266.
- Underwood, W. 2012. The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science* 3:85.

- Valent, B., and Khang, C.H. 2010. Recent advances in rice blast effector research. *Current Opinion in Plant Biology* 13:434-441.
- Van Der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* 23:454-456.
- van der Merwe, M.M., Walker, J., Ericson, L., and Burdon, J.J. 2008. Coevolution with higher taxonomic host groups within the *Puccinia/Uromyces* rust lineage obscured by host jumps. *Mycological Research* 112:1387-1408.
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A.O., Yu, X., Ye, W., Tripathy, S., Kale, S.D., Gu, B., Sheng, Y., Sui, Y., Wang, X., Zhang, Z., Cheng, B., Dong, S., Shan, W., Zheng, X., Dou, D., Tyler, B.M., and Wang, Y. 2011. Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *Plant Cell* 23:2064-2086.
- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X., and Zhou, J.M. 2010. A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 22:2033-2044.
- Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, Stefan R., McDonald, N., Wiley, K., Bader, Kai C., Gläßer, C., Mukhtar, M.S., Haigis, S., Ghamsari, L., Stephens, Amber E., Ecker, Joseph R., Vidal, M., Jones, Jonathan D.G., Mayer, Klaus F.X., Ver Loren van Themaat, E., Weigel, D., Schulze-Lefert, P., Dangl, Jeffery L., Panstruga, R., and Braun, P. 2014. Convergent Targeting of a Common Host Protein-Network by Pathogen Effectors from Three Kingdoms of Life. *Cell Host & Microbe* 16:364-375.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L., and Birch, P.R.J. 2007a. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450:115-118.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L., and Birch, P.R. 2007b. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450:115-118.
- Wilson, R.A., and Talbot, N.J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* 7:185-195.
- Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K.V., Cano, L.M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B.J., and Kamoun, S. 2007. Adaptive Evolution Has Targeted the C-Terminal Domain of the RXLR Effectors of Plant Pathogenic Oomycetes. *The Plant Cell* 19:2349-2369.
- Wu, J., Kou, Y., Bao, J., Li, Y., Tang, M., Zhu, X., Ponaya, A., Xiao, G., Li, J., Li, C., Song, M.-Y., Cumagun, C.J.R., Deng, Q., Lu, G., Jeon, J.-S., Naqvi, N., and Zhou, B. 2015. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector AvrPi9 that triggers Pi9-mediated blast resistance in rice. *New Phytologist* 206:1463-1475.
- Wu, S., Lu, D., Kabbage, M., Wei, H.L., Swingle, B., Records, A.R., Dickman, M., He, P., and Shan, L. 2011. Bacterial effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* innate immunity at the plasma membrane. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:585-593.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., and Zhou, J.M. 2008. *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current biology : CB* 18:74-80.
- Xiao, J.-Z., Ohshima, A., Kamakura, T., Ishiyama, T., and Yamaguchi, I. 1994. Extracellular Glycoprotein(s) Associated with Cellular Differentiation in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:639-644.
- Xue, M., Yang, J., Li, Z., Hu, S., Yao, N., Dean, R.A., Zhao, W., Shen, M., Zhang, H., Li, C., Liu, L., Cao, L., Xu, X., Xing, Y., Hsiang, T., Zhang, Z., Xu, J.-R., and Peng, Y.-L. 2012. Comparative Analysis of the Genomes of Two Field Isolates of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics* 8:e1002869.

- Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S., and Terauchi, R. 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21:1573-1591.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Dominguez, Y., and Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41:973-981.
- Zaparoli, G., Barsottini, M.R., de Oliveira, J.F., Dyszy, F., Teixeira, P.J., Barau, J.G., Garcia, O., Costa-Filho, A.J., Ambrosio, A.L., Pereira, G.A., and Dias, S.M. 2011. The crystal structure of necrosis- and ethylene-inducing protein 2 from the causal agent of cacao's Witches' Broom disease reveals key elements for its activity. *Biochemistry* 50:9901-9910.
- Zellerhoff, N., Jarosch, B., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., and Schaffrath, U. 2006. Nonhost resistance of barley is successfully manifested against *Magnaporthe grisea* and a closely related *Pennisetum*-infecting lineage but is overcome by *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1014-1022.
- Zeyen, R.J., Carver, T.L.W., Lyngkjær, M.F., Zeyen, R.J., Carver, T.L.W., and Lyngkjær, M.F. 2002. Epidermal cell papillae. Pages 107-125 in: *The powdery mildews. A comprehensive treatise*, T.L.W. Carver and T.L.W. Carver, eds. APS Press, St. Paul, MN.
- Zhang, H., Li, D., Wang, M., Liu, J., Teng, W., Cheng, B., Huang, Q., Wang, M., Song, W., Dong, S., Zheng, X., and Zhang, Z. 2012. The *Nicotiana benthamiana* Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade and WRKY Transcription Factor Participate in Nep1_{Mo}-Triggered Plant Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:1639-1653.
- Zhou, B.-J., Jia, P.-S., Gao, F., and Guo, H.-S. 2012. Molecular Characterization and Functional Analysis of a Necrosis- and Ethylene-Inducing, Protein-Encoding Gene Family from *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:964-975.
- Zipfel, C., and Felix, G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* 8:353-360.

6 DANKSAGUNG

Im Anschluss an die Fertigstellung dieser Arbeit bleibt es mir noch ein besonderes Bedürfnis mich bei einer ganzen Reihe von Menschen zu bedanken.

Zu allererst gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater PD Dr. Ulrich Schaffrath, unter dessen Betreuung ich sehr viel Fachliches in Bezug auf Theorie und Praxis lernen, aber auch viele neue Erkenntnisse darüber hinaus gewinnen konnte. Vielen Dank für die aufschlussreiche Zeit und die vielen interessanten Diskussionen!

An zweiter Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Holger Deising bedanken, dessen Feedback meine Motivation und den Glauben an meine Arbeit sehr gestärkt hat.

Für die besonders kurzfristige Zusage zur Erstellung eines dritten Berichtes über diese Arbeit bedanke ich mich besonders bei Prof. Dr. Ralph Panstruga.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei der Leitung des Instituts für Bio3 Prof. Dr. Alan Slusarenko bedanken, der mir ermöglicht hat diese Arbeit am Lehrstuhl anzufertigen.

Desweiteren danke ich meinem dritten Prüfer Prof. Dr. Uwe Conrath, sowie meinem Vorsitzenden Prof. Dr. Andreas Schäffer, die mir freundlicherweise im letzten Teil meiner Promotion, der mündlichen Prüfung, zur Seite standen.

Großer Dank gilt auch Thomas Kroj (INRA, Montpellier) für die freundliche Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen, besonders während meines kurzen Besuchs in Montpellier.

Dr. Ralf Horbach (Martin Luther Universität, Halle Wittenberg) und besonders Dr. Lauren S. Ryder (Exeter University, UK) haben mich in die wundersamen Weiten der Pilztransformation und Dr. Jochen Kleemann (MPIZ, Köln) in die Zelltodassays in Tabak eingeführt. Danke, dass ihr mir eure Tricks und Kniffe verraten habt - ohne euch hätte ich das nicht geschafft!

Meine beiden Bachelorstudenten Samantha Langer und Philipp M. Bertram waren eine besondere Unterstützung für mich. Ihr habt tolle Arbeit gemacht und mich mal auf eine ganz andere Art herausgefordert.

Ohne meine lieben Kollegen hätte ich mich sehr einsam gefühlt, denn gegenseitiges Leidklagen und zur Hand gehen waren, neben dem Teilen von Erfahrungen, doch immer wieder eine große Entlastung und Motivation! Danke in besonderem Maß an Denise, Marco, Christian und natürlich Rhoda!

Auch die anderen lieben Kollegen innerhalb des gesamten Instituts möchte ich an dieser Stelle erwähnen, da ich ohne sie sehr viel weniger Spaß zwischen den Arbeitszeiten gehabt hätte. Dies betrifft die alltägliche Mensapause, freitags mit Horoskop und „Tisch für zwei“, und so manches Feierabendbierchen. Dank hier besonders an Caspar und Ruth!

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir immer wieder zugehört und mich unterstützt haben. Besonders auch bei meinem Bruder Nico, der mir beim Formatieren dieses Dokumentes mit Rat und Tat zur Seite gestanden und tatsächlich für jedes Problem eine Lösung gefunden hat.

Felix, ohne dich hätte ich das nicht geschafft, danke für deine Liebe und Geduld!

7 LEBENS LAUF

Name: Mogga, Valerie Laura
Anschrift: Mauerstr. 15, 52064 Aachen
Email: mogga@bio3.rwth-aachen.de, val.mo@web.de
Geburtsdatum: 27.11.1983
Geburtsort: Siegburg
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Nationalität: deutsch

Studium:

08/10 – 10/16

Promotion

am Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen (Bio3)

Titel: „Analyse von Effektorproteinen in Interaktionen von Pilzen der Gattung *Pyricularia* (*Magnaporthe*) mit Gerste“

06/10:

Diplom

Hauptfach: Phytopathologie und Biochemie

Nebenfächer: Molekulare Biotechnologie

Zellbiologie

Umwelthygiene

(Note: Sehr gut)

08/09 – 05/10

Diplomarbeit

am Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen (Bio3)

Titel: „Analyse differenziell regulierter *Magnaporthe*-Gene während Wirt- und Nichtwirtinteraktion mit Gerste“

10/03:

Beginn des Diplomstudiengangs in Biologie an der RWTH Aachen

Schulische Ausbildung:

07/94 – 06/03

Allgemeine Hochschulreife

Ritzefeld Gymnasium (Stolberg Rhld.)

07/92 – 06/94

Gemeinschaftsgrundschule Gressenich (Stolberg Rhld.)

07/90 – 06/92

Diesterweg Grundschule (Bielefeld)

Forschungsaufenthalte:

- 08/12 College of Life and Environmental Sciences (University of Exeter, Devon, UK)
- 04/11 Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung (Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Halle, Saale)

Publikation:

Mogga V., Delventhal R., Weidenbach D., Langer S., Bertram P.M., Andresen K., Thines E., Kroj T. und Schaffrath U. (2016). Secreted *Magnaporthe oryzae* effector proteins interfere with host infection and counter-act cell death caused by *Magnaporthe*-NLPs in tobacco. *Plant Cell Reports*, 35(5):1169-85

Vorträge:

Mogga V., Delventhal R., Bertram P.M., Kroj T. und Schaffrath U. (2015). Comparative analysis of Candidate Effector Genes in different *Magnaporthe* species. COST Action SUSTAIN workshop on Pathogen-informed Crop Improvement, Wageningen, Niederlande

Mogga V. und Schaffrath U. (2014). Investigation of potential pathogenicity factors in *Magnaporthe oryzae* : MoNLPs and MoNUDIX. DPG-Arbeitskreistagung Wirt-Parasit-Beziehungen, Aachen

Delventhal R., **Mogga V.**, Weidenbach D. und Schaffrath U. (2011). Transcriptome analysis of host and nonhost interactions between barley and the fungus *Magnaporthe*. PR-Proteins and Induced Resistance against Pathogens and Insects, Neuchatel, Schweiz

Delventhal R., **Mogga V.**, Weidenbach D. und Schaffrath U. (2011). Transcriptome analysis of host and nonhost interactions between barley and the fungus *Magnaporthe*. 1st European Congress of Biotechnology and Breeding, Szeged, Ungarn

Delventhal R.; Zellerhoff N.; **Mogga V.**; Weidenbach D.; Andresen K.; Thines E. und Schaffrath U. (2010). Initiating TritNONHOST: Genomic and genetic analysis of host and nonhost interactions between barley and *Magnaporthe*. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Berlin

Delventhal R., Zellerhoff N., **Mogga V.**, Weidenbach D., Andresen K., Thines E. und Schaffrath U. (2010). Initiating TritNONHOST: Genomic and genetic analysis of host and nonhost interactions between barley and *Magnaporthe*. DPG-Arbeitskreistagung Wirt-Parasit-Beziehungen, Konstanz

Poster:

Mogga V., Delventhal R., Kroj T. und Schaffrath U. (2013). Investigation of Candidate Effector Genes in different *Magnaporthe* species. 6. Effectome meeting, Lauret, Frankreich

Mogga V., Delventhal R., Weidenbach D. und Schaffrath U. (2012). Expression studies of Candidate Effector Genes in different *Magnaporthe* species. 11th European Conference on Fungal Genetics, Marburg

Delventhal R., **Mogga V.**, Weidenbach D. und Schaffrath U. (2011). Transcriptome analysis of host and nonhost interactions between barley and the rice blast fungus *Magnaporthe*. International Symposium SFB648, Halle (Saale)

Tabelle 8. Liste verwendeter Chemikalien

Agarose	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biotin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Carbenicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fotochemikalien Carestream GBX Fixer/ Replenisher und Developer/Replenisher	Kodak, Rochester, NY, USA
Geneticin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glucanex	Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark
Hygromycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nikotinsäure	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
PABA	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Pyridoxin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Riboflavin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Rifampicin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spectinomycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thiamin	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Tween20	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 9: Liste verwendeter Enzyme

BP-Clonase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DnaseI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
FastDigest® Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LR-Clonase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phusion® Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNaseA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Silver Star Taq-Polymerase	EuroGenTec S.A., Seraing, Belgien
T4 Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tabelle 10. Liste verwendeter Geräte

Sterilbank LabGard Class II	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Ultra low freezer (-80 °C)	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtigen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Mikrowelle Privileg 9023	Whirlpool Corporation, Benton Harbor, MI, USA
Horizontalschüttler KS501digital	IKALabortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Schüttler für Flüssigkulturen	Gallenkamp, Loughborough, UK
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

Megafuge 1.0 R	Heraeus Industries, Hanau, Deutschland
Centrifuge Sorvall™ RC 5B PLUS	GMI Inc., Ramsey, MN, USA
Micropulser	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
UV crosslinker	Amersham Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Tecnoclav, Fedegari	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald, Deutschland
Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH, Wetterberg, Deutschland
Autoklav Systec DX-65	Systec GmbH, Wetterberg, Deutschland
Dampfdrucktöpfe	Fissler, Idar-Obertstein, Deutschland
Wasserbad Paratherm II	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
VortexGenie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Tischwaage SCALTEC SBA52	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Inkubationsblock Thriller	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermoblock Unitek™ HBS-130	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelelektrophoresekammern	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Geldokumentation UV Transilluminator	WealTEC Corporation, Sparks, NV, USA

Tabelle 11: Liste verwendeter Kits

Platinum® SYBR® Green RT-qPCR Super-Mix, UDG with Rox	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN AG, Hilden, Deutschland

Tabelle 12: Liste verwendeter Software

7300 System SDS Software Version 1.4.0.25 (q-PCR)	Applied Biosystems by Life Technologies, Bleiswijk, Niederlande
BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.5.3	Softwareentwickler Tom Hall
Clone Manager Professional Suite Version 8	Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA
Corel Photo-Paint X4 2008 Version 14.0.0.567	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
CorelDRAW X4 2008 Version 14.0.0.567	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
DeVision G Decon (Geldokumentation)	Science Tec GmbH, Hohengandern, Deutschland
Diskus Carl (Digitale Mikroskopie)	H. Hilgers-Technisches Büro, Königswinter, Deutschland
Microsoft Excel 2010	Microsoft, Redmond, OR, USA
SigmaStat 3.1	Systat Software Inc., Chicago, IL, USA

Tabelle 13: Liste sonstiger Labormaterialien

ABI Prism® 7300 Sequence Detection System	Applied Biosystems by Life Technologies, Bleiswijk, Niederlande
Autoklav Systec DX-65	Systec GmbH, Wetterberg, Deutschland
Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH, Wetterberg, Deutschland
Centrifuge Sorvall™ RC 5B PLUS	GMI Inc., Ramsey, MN, USA
Dampfdrucktöpfe	Fissler, Idar-Obertstein, Deutschland
Feinwaage MS204S	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Geldokumentation UV Transilluminator	WealTEC Corporation, Sparks, NV, USA

Gelelektrophoresekammern	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Horizontalschüttler KS501digital	IKALabortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Inkubationsblock Thriller	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Inkubationsschrank (37 °C)	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtigen, Deutschland
Inkubationsschrank FKS 5000 (23 °C)	Liebherr, Kirchdorf, Deutschland
Inkubationsschrank I26 (28 °C)	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtigen, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Leica DMR, DMRBE (Mikroskope)	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Lichtschrank Growth Cabinet MLR-350	Sanyo, München, Deutschland
Magnetrührer Combima-RET	IKALabortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus Industries, Hanau, Deutschland
Micropulser	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mikrowelle Privileg 9023	Whirlpool Corporation, Benton Harbor, MI, USA
Nanophotometer P-Class	IMPLEN Inc., LA, CA, USA
Nikon 50D (Digitalkamera)	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
PCR peqSTAR 96 Universal	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH Meter MP220	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
Photometer DU530	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Precellys24 lysis & homogenization	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Reinstwasseranlage	Arium pro VF, Sartorius stedium, biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Schüttler für Flüssigkulturen	Gallenkamp, Loughborough, UK
Spektrophotometer Beckman DU	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Sterilbank LabGard Class II	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Tecnoclav, Fedegari	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald, Deutschland
Thermoblock Unitek™ HBS-130	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Tischwaage SCALTEC SBA52	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultra low freezer (-80 °C)	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtigen, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
UV crosslinker	Amersham Life Sciences, Freiburg, Deutschland
VortexGenie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waring® Blender	Conair Corporation, Stamford, USA
Wasserbad Paratherm II	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
