

Biologie

**Molekulargenetische Untersuchungen zum Abbau pflanzlicher
Zellwände durch den phytopathogenen Pilz *Fusarium
graminearum*: Cellulasen und ihre Regulation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von
Heiko Bauknecht
aus Münster**

2004

Dekan:	Prof. Dr. A. Steinbüchel
Erster Gutachter:	Prof. Dr. B. Moerschbacher
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Stöcker
Tag der mündlichen Prüfung:	26.07.2004
Tag der Promotion:	26.07.2004

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Das Phytopathogen <i>Fusarium graminearum</i>	2
1.1.1	Systematische Einordnung	3
1.1.2	Die Eroberung Mitteleuropas	4
1.1.3	Die Infektion von Weizen und die Bildung von Mycotoxinen	4
1.1.4	Bekämpfungsstrategien	7
1.2	Die pflanzliche Zellwand	8
1.2.1	Der Aufbau der pflanzlichen Zellwand	9
1.2.2	Aufbau und Struktur von Cellulose	11
1.3	Abbau pflanzlicher Zellwände	13
1.3.1	Abbau von Cellulose in pflanzlichen Zellwänden	14
1.3.2	Aufbau, Reaktionsmechanismen und wirtschaftliche Anwendungen von Cellulasen	17
1.3.2.1	Katalytische Domänen	17
1.3.2.2	„Carbohydrate binding modules“, Linker und Signalpeptide	19
1.3.2.3	Reaktionsmechanismen	20
1.3.2.4	Anwendungen von Cellulasen	22
1.3.3	Zellwandabbauende Enzyme als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren	23
1.4	Regulation von Cellulasen	24
1.4.1	Induktoren und Repressoren der Expression von Cellulasen	24
1.4.2	Transkriptionsfaktoren	25
1.4.2.1	Transkriptionsfaktor CRE	25
1.4.2.2	Transkriptionsfaktor ACEI	26
1.4.2.3	Transkriptionsfaktor ACEII	28
1.4.2.4	Transkriptionsfaktor XlnR	28
1.4.2.5	Transkriptionsfaktoren HAP	29
1.5	Ziele der Arbeit	29

2	Material und Methoden	32
2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>, <i>F. graminearum</i> und <i>T. aestivum</i>	33
2.1.1	Stammhaltung von <i>Fusarium graminearum</i> K59	33
2.1.2	Induktionsmedien für <i>F. graminearum</i>	34
2.1.3	Ernte des Mycels	35
2.1.4	Sporenproduktion von <i>F. graminearum</i>	35
2.1.5	Stammhaltung von <i>E. coli</i> DH10B	36
2.1.6	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	36
2.1.7	Anzucht von Weizen (<i>Triticum aestivum</i> L.)	37
2.1.8	Infektion von Weizenpflanzen mit <i>F. graminearum</i>	37
2.1.9	Inkubation von Weizenähren in sterilen Gläsern	38
2.2	Transformationen	39
2.2.1	Transformation von <i>E. coli</i>	39
2.2.2	Transformation von <i>F. graminearum</i>	39
2.2.3	KO1-Vektor zur Transformation von <i>F. graminearum</i>	41
2.3	Ligation und PCR	44
2.3.1	Ligation in pGem-T	44
2.3.2	PCR	44
2.3.3	Inverse PCR	45
2.3.4	RT-PCR und cDNA Synthese	46
2.3.5	Kolonie-PCR und Plasmidisolierung	47
2.3.6	Agarosegele	48
2.3.7	Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	49
2.4	DNA und RNA Isolation	49
2.4.1	Nukleinsäureisolation	49
2.4.2	RNA Isolation	50

Inhalt

2.4.3	DNA Isolation	50
2.5	Auswertung und Bearbeitung von Sequenzdaten	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Cellulasen aus <i>F. graminearum</i> K59	54
3.1.1	Das Gen der Cellulase der GH-Familie 6	54
3.1.1.1	Sequenz des <i>cel6</i> -Gens	55
3.1.1.2	Transkription des <i>cel6</i> -Gens	58
3.1.1.3	Proteinsequenz der Cellulase 6 (Cel6)	62
3.1.2	Die Gene der Cellulasen der GH-Familien 7 und 45	68
3.1.2.1	Sequenzen des <i>cel7A</i> -, <i>cel7B</i> - und <i>cel45</i> -Gens	68
3.1.2.1.1	Sequenz des <i>cel7A</i> -Gens	68
3.1.2.1.2	Sequenz des <i>cel7B</i> -Gens	69
3.1.2.1.3	Sequenz von <i>cel45</i> -Gens	70
3.1.2.2	Transkription des <i>cel7A</i> -, <i>cel7B</i> - und <i>cel45</i> -Gens	71
3.1.2.3	Proteinsequenzen der Cellulasen 7A (Cel7A), 7B (Cel7B) und 45 (Cel45)	72
3.2	Der Transkriptionsfaktor ACEI	74
3.2.1	Sequenz des <i>ace1</i> -Gens	74
3.2.2	Transkription des <i>ace1</i> -Gens	78
3.2.3	Proteinsequenz des Transkriptionsfaktors ACEI	83
3.2.4	Alternatives Spleißen der mRNA des <i>ace1</i> -Gens	86
3.2.5	„Knock-out“ des <i>ace1</i> -Gens in <i>F. graminearum</i>	90
3.2.5.1	Vektorkonstruktion	90
3.2.5.2	Transformation von <i>F. graminearum</i>	92
3.2.5.3	Wachstum von <i>F. graminearum</i> Wildtyp und $\Delta ace1$ auf Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	97
3.2.5.4	Infektion von Weizenähren mit <i>F. graminearum</i> $\Delta ace1$ und <i>F. graminearum</i> Wildtyp	99
3.3	Intronalignment	101

Inhalt

3.4	„Survey“ von Genen mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in <i>F. graminearum</i> PH-1	103
3.4.1	„Survey“ von Cellulasen	103
3.4.2	„Survey“ von β -Glucosidasen	106
3.4.3	„Survey“ von Transkriptionsfaktoren	107
3.4.4	Stammbaum von Cellulasen und β -Glucosidasen	108
3.4.5	Übersicht über Enzyme und Transkriptionsfaktoren mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in <i>F. graminearum</i> PH-1	110
4	Diskussion	113
4.1	Das Cellulasesystem von <i>F. graminearum</i>	114
4.1.1	Cellulasegene aus <i>F. graminearum</i> K59	114
4.1.2	Transkription der Cellulasegene <i>cel6</i> , <i>cel7A</i> , <i>cel7B</i> und <i>cel45</i>	115
4.1.3	Proteinsequenzen von Cel6, Cel7A, Cel7B und Cel45	121
4.1.4	„Survey“ von Cellulasen im Genom von <i>F. graminearum</i> PH-1	124
4.1.5	„Survey“ von Glucosidasen im Genom von <i>F. graminearum</i> PH-1	127
4.1.6	Zusammenfassung	128
4.2	Proteine mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in <i>F. graminearum</i> PH-1	129
4.3	Transkriptionsfaktoren zur Regulation von Cellulasegenen	130
4.3.1	Der Transkriptionsfaktor ACEI	130
4.3.1.1	Sequenz, Transkription und Introns des <i>ace1</i> -Gens	130
4.3.1.2	Der ACEI Faktor	131
4.3.1.3	Alternatives Spleißen der internen Introns der <i>ace1</i> -mRNA	131
4.3.1.4	„Knock-out“ des <i>ace1</i> -Gens in <i>F. graminearum</i>	133
4.3.1.5	ACEI – Repressor oder Aktivator der Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen?	134

Inhalt

4.3.1.6	ACEI als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktor von <i>F. graminearum</i>	136
4.3.2	Transkriptionsfaktoren in <i>F. graminearum</i> PH-1	138
5	Ausblick	141
6	Zusammenfassung	143
7	Literaturverzeichnis	145
	Abkürzungsverzeichnis	171
	Anhang	174

1 Einleitung

Pflanzen, Tiere und Menschen unterscheiden sich als Organismen stark voneinander, dennoch teilen sie das Schicksal, verschiedenen Mikroorganismen als Wirte zu dienen und unter einer Vielzahl von Krankheiten zu leiden. Obwohl es in den letzten Jahrzehnten wesentliche Fortschritte bei der Erforschung von Pathogenen gegeben hat, sind durch Mikroorganismen ausgelöste Krankheiten immer noch ein drängendes und ernstzunehmendes Problem.

Spektakuläre Ausbrüche wie die Hühnergrippe im Januar dieses Jahres in Asien, ungelöste Probleme wie das sich weltweit immer noch ausbreitende HI Virus oder die Sorge vor antibiotikaresistenten Tuberkulosestämmen sind nur wenige, auch einer breiteren Bevölkerung präsenste Fälle von Krankheiten bei Tieren und Menschen.

Krankheiten von Pflanzen werden in der Öffentlichkeit weit weniger wahrgenommen. Nur wenige Beispiele wie der Befall von Kartoffeln durch den Pilz *Phytophthora infestans* und die damit verbundene Hungersnot in Irland oder die als Ergotismus (Mutterkornvergiftung) bekannte Folge vom Verzehr mit Toxinen des Pilzes *Claviceps purpurea* kontaminierter Lebensmittel haben einen höheren Bekanntheitsgrad.

Krankheiten von Pflanzen sind trotz ihrer geringen Beachtung in der Öffentlichkeit von immenser Bedeutung. Pflanzen sind direkt oder indirekt Lieferant aller Nahrungs- und Futtermittel von Mensch und Tier. Bereits heute werden durch Pflanzenkrankheiten jährlich große Mengen an Nahrungs- und Futtermitteln weltweit vernichtet. Durch die Reduzierung der für die Welternährung wichtigen Nutzpflanzen auf immer weniger Sorten von immer weniger Arten und den industriellen Anbau dieser Sorten in Monokulturen ist eine Zunahme der Ernteverluste durch Pflanzenkrankheiten anzunehmen.

Der Schutz von Pflanzen vor Krankheiten, der bereits heute eine wesentliche Rolle im Pflanzenanbau spielt, wird daher in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen. Die

Einleitung

Erhöhung der Resistenzen von Nutzpflanzen durch Züchtung oder gentechnische Modifikationen wird dabei ebenso wichtig sein wie die effektivere Bekämpfung von Phytopathogenen. Für die Entwicklung resistenter Nutzpflanzen und neuer Strategien zur Bekämpfung von Phytopathogenen ist ein genaues Verständnis der Entstehung von Pflanzenkrankheiten nötig. Mit der Erforschung von Pflanzenkrankheiten, den sie auslösenden Phytopathogenen und deren Bekämpfung beschäftigt sich die Phytopathologie.

Neben Viren und Bakterien sind es vor allem Pilze, die als Phytopathogene Pflanzenkrankheiten auslösen. Ein Beispiel eines solchen pilzlichen Phytopathogens ist der Getreideschädling *Fusarium graminearum*. Obwohl *F. graminearum* jährlich große Ernteaufälle im Getreideanbau verursacht und nur unzureichend bekämpft werden kann, ist erst wenig über dieses Mycotoxine produzierende Phytopathogen bekannt.

Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit mit einem Aspekt der Infektion von Pflanzen durch *F. graminearum*, dem Abbau pflanzlicher Zellwände. Neben dem Potential von *F. graminearum* zum enzymatischen Abbau von Cellulose und anderer pflanzlicher Zellwandpolymere wird auch die Bedeutung eines an der Regulation von Cellulasegenen beteiligten Transkriptionsfaktors als möglicher Virulenz- oder Pathogenitätsfaktor untersucht.

Die folgende Einleitung gibt einen Überblick über den Pilz *F. graminearum* (Kapitel 1.1), den Aufbau (Kapitel 1.2) und den Abbau (Kapitel 1.3) pflanzlicher Zellwände sowie über die Regulation von Cellulasegenen (Kapitel 1.4). Am Ende der Einleitung werden die Ziele dieser Arbeit definiert (Kapitel 1.5).

1.1 Das Phytopathogen *Fusarium graminearum*

Die Gattung *Fusarium* wurde 1809 basierend auf der Art *Fusarium roseum* von Link ins Leben gerufen [Booth, 1971]. *F. graminearum* (Abb. 1.1) kann als eine der phytopathogenen Arten dieser Gattung Krankheiten auf zahlreichen Gräsern auslösen.

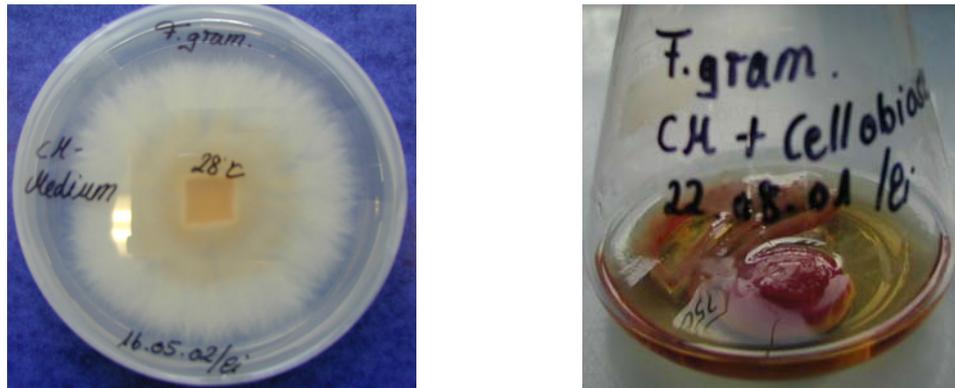


Abb. 1.1: Wachstum von *F. graminearum* auf festem (links) und in flüssigem (rechts) Medium. Quelle: eigene Aufnahmen.

In den folgenden Kapiteln soll das Pathogen *F. graminearum* vorgestellt werden. Dazu werden neben einer systematischen Einordnung (Kapitel 1.1.1) und der Geschichte des Pilzes in Mitteleuropa (Kapitel 1.1.2) vor allem die Infektion von Weizen (Kapitel 1.1.3) und mögliche Bekämpfungsstrategien (Kapitel 1.1.4) besprochen.

1.1.1 Systematische Einordnung

Systematisch gehört der Pilz *F. graminearum* Schwabe (Teleomorph *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) innerhalb der Abteilung der Ascomycota in die Ordnung der Hypocreales. In diese Ordnung gehören neben *Gibberella* (*G. zeae* und *G. fujikuroi*) Gattungen wie *Nectria* (*N. haematococca*), *Claviceps* (*C. purpurea*) und *Hypocrea* (*H. jecorina*). *F. graminearum* befindet sich damit in naher Verwandtschaft zu einer Reihe weiterer phytopathogener Pilze wie *Gibberella fujikuroi* („foolish seedling disease of rice“) oder *Fusarium oxysporum* („wilts“) sowie zu sehr gut untersuchten saprophytischen Pilzen wie *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) [Agrios, 1997].

Die Art *F. graminearum* wurde lange Zeit in zwei Gruppen unterteilt, die als Gruppe 1 und 2 bezeichnet wurden. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei

diesen Gruppen um eigene Arten handelt. Aus der Gruppe 1 wurde *Fusarium pseudograminearum*, die Gruppe 2 behielt den Namen *F. graminearum* [Aoki und O'Donnell, 1999].

1.1.2 Die Eroberung Mitteleuropas

Die Bedeutung des Phytopathogens *F. graminearum* hat in den letzten Jahrzehnten in Deutschland und Mitteleuropa stark zugenommen. Bis zu den 80er Jahren war *F. graminearum* als Phytopathogen vorwiegend aus Nordamerika bekannt, während es in Europa zwar präsent, aber nur selten als Phytopathogen von Kulturpflanzen isoliert werden konnte. Seit den 80er Jahren hat *F. graminearum* als Phytopathogen in Mitteleuropa stark an Bedeutung gewonnen [Rintelen, 2000; Tomczak *et al.*, 2002]. Als Grund dafür wird der stark angestiegene Anbau von Mais gesehen (1972 bis 1999 stieg die Fläche um ca. 390 %) [Eder, 2000]. Es wird angenommen, dass *F. graminearum* vor allem auf Maisrückständen auf den Feldern gut überwintern kann. Die Folge ist ein erhöhtes Inokulum im darauf folgenden Jahr mit einer erhöhten Infektionsrate. Untersuchungen zeigen, dass der Anbau von Mais eine erhöhte Infektionsrate beim Anbau von Weizen im Folgejahr nach sich ziehen kann [Parry *et al.*, 1995; Beck und Lepschy, 2000; Xu, 2003].

1.1.3 Die Infektion von Weizen und die Bildung von Mycotoxinen

F. graminearum kann eine Reihe von Krankheiten auf verschiedenen Wirtspflanzen auslösen. Das Wirtsspektrum von *F. graminearum* umfasst, wie bereits der Name des Pilzes andeutet, Gräser. Die wichtigsten Kulturpflanzen der Menschheit stammen aus dieser Pflanzengruppe und ein Großteil der Kalorien, die Menschen und Tiere verbrauchen, stammen von Weizen und Mais, die beide von *F. graminearum* befallen werden können. Neben Weizen und Mais gibt es Berichte über Infektionen von weiteren Grasarten wie Gerste, Hafer oder Triticale [Sutton, 1982; Bottalico und

Einleitung

Perrone, 2002; Logrieco *et al.*, 2002; Capettini *et al.*, 2003; Munkvold, 2003]. Der Befall von Weizen und anderen Nutzgräsern tritt weltweit auf und kann zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führen [Parry *et al.*, 1995; Nganje *et al.*, 2001; Pirgozliev *et al.*, 2003; Southwell *et al.*, 2003]. Die Infektion von Weizen und ihre Auswirkungen sollen im folgenden detailliert beschrieben werden.

Bei einem Befall von Weizenähren (*Triticum aestivum* L., Abb. 1.2) kann es zu einer Reduzierung des Körnergewichtes und zur Bildung von Mycotoxinen kommen. Die Infektion führt zu einem Ausbleichen der Ähren und wird daher auch „Fusarium Head Blight“ (FHB) genannt. Weitere Namen für diese Krankheit sind „Fusarium Ear Blight“ (FEB) und „Scab“ [Parry *et al.*, 1995; Doohan *et al.*, 2003].



Abb. 1.2: Weizenähren (*Triticum aestivum* L.) der Sorte Bobwhite, inokuliert mit Wasser (links) oder *F. graminearum* (rechts). Quelle: eigene Aufnahmen.

Der Pilz überwintert als Mycel auf Pflanzenresten und bildet dort das neue Inokulum. Als primäres Inokulum werden Ascosporen angenommen, die auf Pflanzenresten in Perithezien gebildet werden. Aber auch Mycel und Makrokonidien können als primäres Inokulum nicht ausgeschlossen werden. Die Ascosporen werden hauptsächlich über den Wind vom Boden auf die Pflanzen transportiert, während Makrokonidien vor allem von Regenspritzern auf die Pflanzen geschleudert werden [Burgess, 1981; Sutton, 1982; Parry *et al.*, 1995; Xu, 2003].

Nach dem Auskeimen der Konidien dringen die Hyphen vor allem über geöffnete Stomata in die Pflanzen ein [Pritsch *et al.*, 2000]. Eine direkte Penetration von

Einleitung

Epidermiszellen scheint aber ebenfalls möglich zu sein [Wanjiru *et al.*, 2002]. Die Infektion ist dabei auf die blühenden Ähren begrenzt und findet nur in dem engen Zeitfenster der Blüte der Wirtspflanzen statt. Zudem müssen bestimmte klimatische Voraussetzungen erfüllt sein. So ist ein Befall nur möglich, wenn über mehrere Tage feucht-warme Bedingungen vorliegen [Andersen, 1948].

In der Pflanze bilden sich aus dem Mycel Infektionshyphen, die die Wirtszellen penetrieren und abtöten. Von der Landung der Makrokonidien auf der Ähre bis zur Produktion neuer Makrokonidien vergehen lediglich 48-76 h [Pritsch *et al.*, 2000]. Diese Makrokonidien werden in großer Zahl produziert und können dann zu einer epidemischen Verbreitung des Pilzes innerhalb kurzer Zeit führen. Die Zeit, die der Pilz zum vollständigen Ausbleichen einer Ähre benötigt, beträgt lediglich wenige Tage [Andersen, 1948; Pritsch *et al.*, 2000].

Die Produktion von Mycotoxinen durch *F. graminearum* während der Infektion stellt ein besonderes Problem dar, da diese Toxine nicht nur phytotoxische Wirkungen haben, sondern auch toxisch für Tiere und Menschen sind. Viele der gebildeten Toxine sind relativ hitzebeständig. Toxine ließen sich auch nach einer Verarbeitung kontaminierten Getreides zu Produkten wie Brot oder Bier nachweisen. Auch das Backen oder Kochen kontaminierter Lebensmittel führte nicht zu einem vollständigen Verschwinden der Toxine [Patey und Gilbert, 1989]. *F. graminearum* ist als Produzent verschiedener Mycotoxine bekannt, wobei die Toxine Deoxynivalenol (DON oder Vomitoxin, Abb. 1.3 links) und Zearalenon (Abb. 1.3 rechts) die größte Bedeutung haben [Sutton, 1982; Vesonder und Golinski, 1989; Bruins *et al.*, 1993; Bagi *et al.*, 2000; Mesterhazy, 2002].

DON gehört zur Gruppe der Trichothecene, bei denen es sich um Sesquiterpene pilzlichen Ursprungs handelt. Neben DON gehören in diese Gruppe weitere Mycotoxine wie das T2-Toxin oder Nivalenol [Sweeney und Dobson, 1998]. DON ist vor allem in der Schweinezucht ein Problem, da Schweine bereits in geringer Konzentration des Giftes mit Nahrungsverweigerung und Erbrechen reagieren, mit entsprechenden Folgen für das Wachstum der Tiere [Conkova *et al.*, 2003].

Einer der bekannten Virulenzfaktoren aus *F. graminearum* stammt aus dem Biosyntheseweg von Trichothecenen. Die Ausschaltung eines Gens dieses

Einleitung

Biosyntheseweges (Trichodien Synthase), der für die Bildung von Mycotoxinen wie DON verantwortlich ist, führte zu einer reduzierten Virulenz des Pilzes auf Weizen und Roggen [Proctor *et al.*, 1995, 1997 und 2002; Desjardins *et al.*, 1996 und 2000].

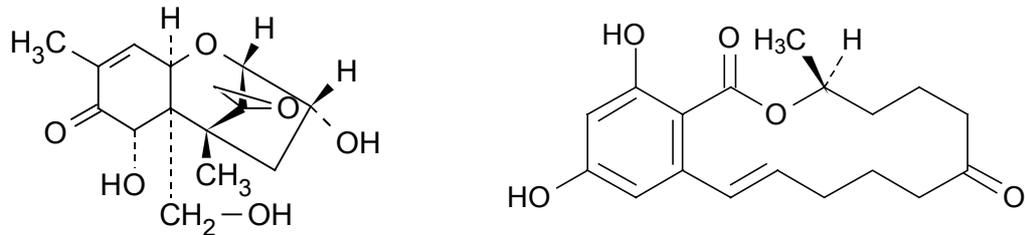


Abb. 1.3: Mycotoxine von *F. graminearum*: Deoxynivalenol (DON) (links) und Zearalenon (rechts). Quelle: verändert nach CD Römpp Chemie Lexikon, 1995.

Es gibt in einigen Ländern wie den USA, Kanada und Österreich bereits Grenzwerte für DON in Lebens- und Futtermitteln, die bei 0,5-2 mg/kg für Nahrungs- und zwischen 5 und 10 mg/kg für Futtermittel liegen [Lepschy, 2000]. Ist die Konzentration der Toxine im Getreide zu hoch, so kann es nicht mehr verzehrt oder verfüttert werden. Derart stark kontaminiertes Getreide wird entweder mit nicht kontaminiertem Getreide vermischt oder zur Stromerzeugung verbrannt [Landwirtschaftskammer, persönliche Mitteilung].

Zearalenon ist ein weiteres Mycotoxin, das von *F. graminearum* während einer Infektion gebildet werden kann. Es hat östrogene Wirkungen auf Schweine und Rinder und kann zu Unfruchtbarkeit führen [Conkova *et al.*, 2003].

1.1.4 Bekämpfungsstrategien

Ein kompletter Schutz des Getreides vor *F. graminearum* ist bisher nicht möglich. Der Befall von Weizen kann aber durch unterschiedliche Methoden reduziert werden.

Das Entfernen von Ernterückständen (vor allem von Mais), z.B. durch tiefes Umpflügen, kann den Befall durch *F. graminearum* im Folgejahr aufgrund einer verminderten Inokulumproduktion reduzieren. Neben den Pflanzenrückständen können auch Unkräuter eine Inokulumquelle darstellen. Die Bekämpfung von Unkräutern auf den Feldern kann sich daher ebenfalls befallsreduzierend auswirken. Ein Fruchtwechsel von Wirts- und Nichtwirtspflanzen von *F. graminearum* kann den Befall ebenfalls reduzieren. Ein Anpflanzen von Weizen nach Mais sollte auf jeden Fall vermieden werden, da die Vorfrucht Mais stark befallsfördernd wirkt [Pirgozliev *et al.*, 2003].

Es gibt verschiedene Fungizide, die gegen *F. graminearum* eingesetzt werden können (z.B. Folicur, Caramba oder ProntoPlus). Die Befallsreduzierung liegt aber häufig nur zwischen 50-60 %. Zudem kann die Bildung von Mycotoxinen nicht verhindert werden. Es gibt Untersuchungen, in denen die Produktion von Mycotoxinen aufgrund einer Behandlung mit Fungiziden noch gesteigert wurde [Mastel und Michels, 2000; Obst und Gammel, 2000; Menniti *et al.*, 2003; Pirgozliev *et al.*, 2003]. Neben chemischen werden zunehmend auch biologische Bekämpfungsmethoden untersucht (beispielsweise reduzieren *Microsphaerosis* Arten die Produktion von Ascosporen durch *F. graminearum*), ohne jedoch bisher zu anwendbaren Produkten oder Verfahren geführt zu haben [Pirgozliev *et al.*, 2003].

Zurzeit wird intensiv versucht, resistente Wirtssorten zu züchten. Dabei kann der Befall von Weizen mit *F. graminearum* reduziert werden, indem man beispielsweise die Wuchshöhe der Pflanzen erhöht, die Wuchsform der Ähren verändert, die Grannenlänge reduziert oder die Toleranz der Pflanzen gegenüber Mycotoxinen erhöht [Parry *et al.*, 1995; Pirgozliev *et al.*, 2003].

1.2 Die pflanzliche Zellwand

Die pflanzliche Zellwand dient der Zelle als formgebendes und stabilisierendes Gerüst sowie als Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen [Levy *et al.*, 2002]. In den folgenden Kapiteln soll der Aufbau pflanzlicher Zellwände im Allgemeinen

(Kapitel 1.2.1) und der Aufbau von Cellulose (Kapitel 1.2.2) im Besonderen beschrieben werden.

1.2.1 Der Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Grundsätzlich werden zwei Typen von Zellwänden unterschieden, die mit Typ I und II bezeichnet werden. Typ I Wände kommen bei Dicotyledonen und nicht commelinoiden Monocotyledonen vor, während der Typ II bei commelinoiden Monocotyledonen vorkommt, zu denen auch die Ordnung der Poales gehört [Henry und Harris, 1997; Carpita und McCann, 2000]. Abb. 1.4 zeigt den Aufbau von Zellwänden des Typs I und einer Gräserzellwand des Typs II.

Während die Struktur der Cellulosefibrillen in den Typ I und II Zellwänden nahezu identisch ist, unterscheidet sich die Vernetzung dieser Fibrillen in den Zellwänden deutlich voneinander. Die Cellulosefibrillen sind in den Zellwänden des Typs II weitgehend durch Glucuronoarabinoxylane (GAX) vernetzt, während diese Vernetzung in den Typ I Zellwänden überwiegend über Xyloglucane (XyG) erfolgt. GAX und XyG kommen in beiden Wandtypen in unterschiedlicher Häufigkeit vor (GAX überwiegen in Typ II, XyG überwiegen in Typ I Wänden). Bei GAX handelt es sich um ein lineares Polymer aus β -1,4-D-Xylosyleinheiten mit verschiedenen Seitenketten, die sich je nach Zellwandtyp zum Teil unterscheiden. So können sich bei GAX in beiden Zellwandtypen Glucuronsäurereste am O2 befinden, während sich Arabinosereste bei GAX in Zellwänden des Typs I meistens am O2, bei GAX in Zellwänden des Typs II immer am O3 befinden. In Typ II Zellwänden können die Arabinosereste zudem über Esterbindungen mit phenolischen Substanzen (vor allem Hydroxyzimtsäuren) verbunden sein.

Innerhalb der Zellwände des Typs II zeichnen sich die Zellwände der Poales, insbesondere während der Wachstumsphasen, durch eine zusätzliche Vernetzung der Cellulosefibrillen durch sogenannte „mixed linkage“ (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4) β -D-Glucane aus, die in Zellwänden des Typs II außerhalb der Gräser nicht vorzukommen scheinen.

Einleitung

Weitere Unterschiede zwischen den Zellwandtypen betreffen den geringen Anteil an Pektinen und Strukturproteinen in Typ II Zellwänden [Carpita und Gibeaut, 1993; Carpita, 1996; Carpita und McCann, 2000]. In Epidermis- und Mesophyllzellwänden aus Maispflanzen wurden die Gewichtsanteile der verschiedenen Zellwandpolymere bestimmt. Neben Cellulose (Mesophyllzellwand 30 %, Epidermiszellwand 60 %) konnten vor allem GAX in größeren Mengen gefunden werden (Mesophyllzellwand 30 %, Epidermiszellwand 20 %). Pektine (10 %) und Xyloglucane (Mesophyllzellwand 7 %, Epidermiszellwand 2 %) machten nur einen kleinen Teil der Zellwände aus [Carpita *et al.*, 2001].

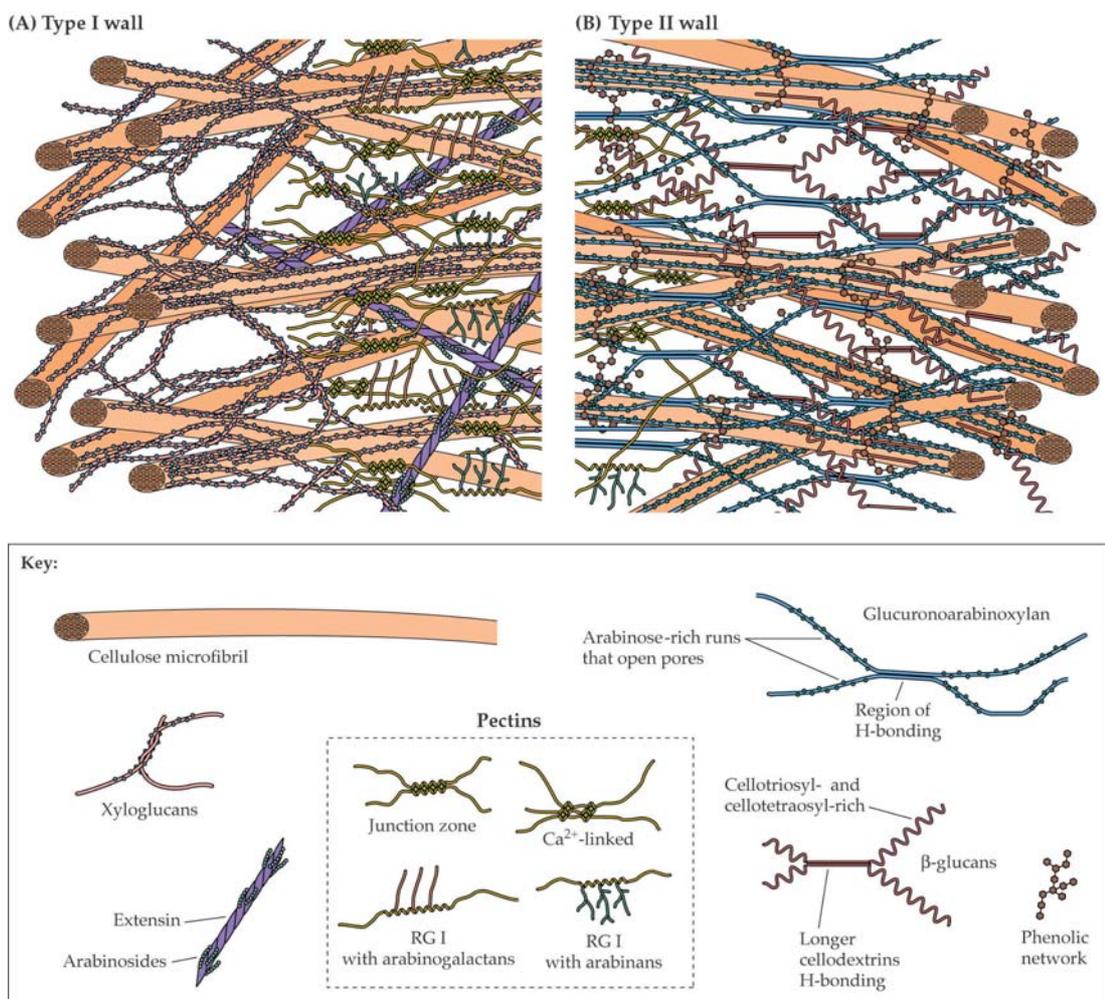


Abb. 1.4: Pflanzliche Zellwände des Typs I und II. Typ I Zellwände kommen in Dicotyledonen und in nicht commelinoiden Monocotyledonen vor, während Typ II Zellwände in commelinoiden Monocotyledonen (z.B. Poales) vorkommen. RG = Rhamnogalacturonan. Quelle: Buchanan *et al.*, 2002.

1.2.2 Aufbau und Struktur von Cellulose

Cellulose ist das häufigste Biopolymer der Erde, das mit einer Jahresproduktion von ca. 10^{15} kg weit vor der des zweitplatzierten Biopolymers Chitin liegt [Brett, 2000]. Cellulose wird zum größten Teil von Pflanzen synthetisiert, obwohl auch Pilze, Bakterien und einige Tiere als Celluloseproduzenten bekannt sind [Grimson *et al.*, 1996; Kimura und Itoh, 1996; Brett, 2000]. Pflanzen synthetisieren Cellulose nicht innerhalb der Zelle, sondern an Proteinkomplexen der Plasmamembran [Brett, 2000]. Cellulose ist einer der Hauptbestandteile pflanzlicher Zellwände und macht zwischen 35 und 50 % des Trockengewichtes von Pflanzen aus [Lynd *et al.*, 2002]. Cellulose ist ein wichtiger Stabilisator pflanzlicher Zellwände, die als eine der Barrieren für den Eintritt von Pathogenen angesehen werden können. Cellulose liegt in der Zellwand eingebettet in eine Matrix aus anderen Polymeren vor, mit denen sie zum Teil vernetzt ist (Kapitel 1.2.1).

Cellulose ist ein Homopolymer, das sich aus Einheiten von zueinander um 180° gedrehten Glucosemolekülen zusammensetzt und dessen sich wiederholende Einheit Cellobiose ist [Kadla und Gilbert, 2000]. Cellobiose besteht aus zwei Molekülen Glucose, die über eine β -1,4-glycosidische Bindung verbunden sind (Abb. 1.5).

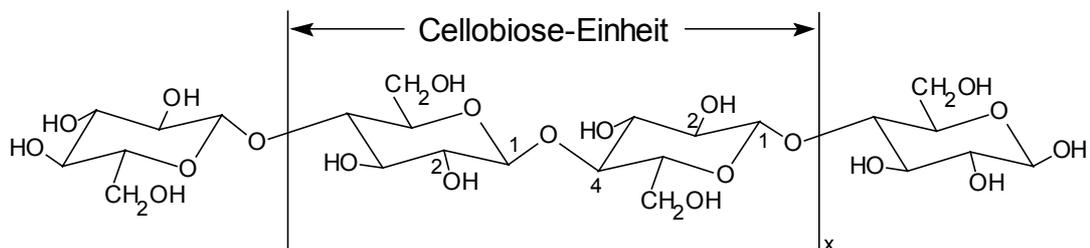


Abb. 1.5: Cellulosemolekül mit der sich wiederholenden Einheit Cellobiose. Die Glucosemoleküle sind gegeneinander um 180° gedreht. Der Polymerisationsgrad beträgt meistens mehrere Tausend. Quelle: verändert nach CD Römpp Chemie Lexikon, 1995.

Cellulosemoleküle bestehen meistens aus mehreren Tausend Einheiten, sind zwischen 1 und $7,7 \mu\text{m}$ lang und können sich über Wasserstoffbrückenbindungen

Einleitung

und Van der Waals Bindungen zu größeren Strukturen aneinander lagern (Abb. 1.6). Die so gebildeten Mikrofibrillen können wesentlich länger sein als die individuellen Cellulosemoleküle, da die Celluloseketten innerhalb der Mikrofibrille an beliebigen Stellen enden und beginnen können [Brett, 2000; Carpita und McCann, 2000].

Die Celluloseketten in den Mikrofibrillen können verschiedene Strukturen ausbilden, die sich von hochkristallinen bis zu amorphen Bereichen erstrecken. Die Peripherie einer Mikrofibrille ist in der Regel weniger kristallin als ihr Kern, was vermutlich auf Wechselwirkungen der Oberfläche mit anderen Zellwandpolymeren zurückzuführen ist (z.B. Bindung von Glucuronoarabinoxylanen an Cellulose) [O'Sullivan, 1997; Brett, 2000]. Hat Cellulose eine kristalline Form angenommen, so sind die Ketten sehr dicht gepackt. Ein Eindringen anderer Moleküle, wie beispielsweise Cellulasen, ist dann nicht möglich [Lynd *et al.*, 2002].

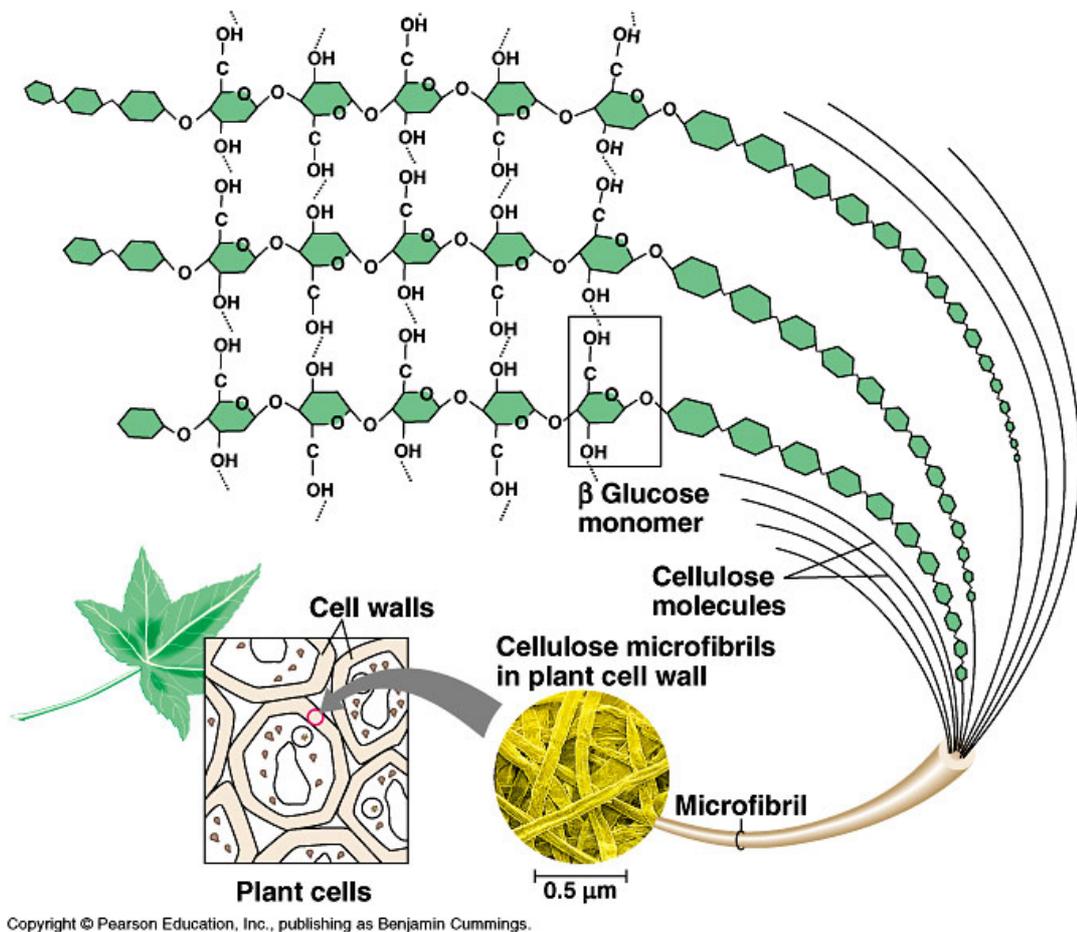


Abb. 1.6: Aufbau einer Mikrofibrille aus Celluloseketten. Quelle: s. Abbildung.

Es sind bisher mindestens vier verschiedene kristalline Hauptpolymorphe von Cellulose bekannt (I-IV), wobei Cellulose I, bei der die Celluloseketten parallel angeordnet sind, das vorherrschende Polymorph in der Natur ist (in einigen Organismen konnte auch Cellulose II nachgewiesen werden). Von diesem Typ I gibt es wiederum zwei Formen, I_{α} und I_{β} , die sich in der Ausbildung der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen unterscheiden. Beide Formen kommen in unterschiedlichen Anteilen in natürlicher Cellulose vor, wobei der Anteil von I_{α} zwischen 70 und 20 % liegt und mit der Höhe der Entwicklungsstufe einer Art abzunehmen scheint [O'Sullivan, 1997; Kadla und Gilbert, 2000].

1.3 *Abbau pflanzlicher Zellwände*

Für eine erfolgreiche Infektion von Pflanzen oder pflanzlichen Zellen ist in der Regel die Überwindung der Zellwand erforderlich. Neben der überwiegend mechanischen Überwindung pflanzlicher Zellwände, wie es z.B. bei den phytopathogenen Pilzen *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum* spp. über die Bildung eines melaninhaltigen Appressoriums geschieht, können pflanzliche Zellwände auch enzymatisch überwunden werden [Mendgen *et al.*, 1996]. In Fusarien konnte bereits der enzymatische Abbau zahlreicher Zellwandpolymere nachgewiesen werden. Die Produkte dieses enzymatischen Abbaus von Zellwandpolymeren können der Ernährung des Pilzes während der Infektion dienen [Urbanek, 1989; Kang und Buchenauer, 2000; Wanjiru *et al.*, 2002].

In den folgenden Kapiteln soll zunächst der Abbau pflanzlicher Zellwände, insbesondere der Abbau von Cellulose und die daran beteiligten Enzyme, beschrieben werden (Kapitel 1.3.1). Auf den molekularen Aufbau von Cellulasen wird im Kapitel 1.3.2 gesondert eingegangen, wobei auch Reaktionsmechanismen und wirtschaftliche Anwendungen von Cellulasen besprochen werden. Kapitel 1.3.3 befasst sich mit der Rolle von zellwandabbauenden Enzymen als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren in phytopathogenen Pilzen.

1.3.1 Abbau von Cellulose in pflanzlichen Zellwänden

Cellulose ist in der pflanzlichen Zellwand mit anderen Polymeren wie Xyloglucanen, Glucuronoarabinoxylanen und β -Glucanen vernetzt (Kapitel 1.2.1). Diese Vernetzung erschwert den direkten Abbau des Polymers in den Zellwänden. Mikroorganismen produzieren daher eine Reihe von Enzymen, die die verschiedenen Polymere in der pflanzlichen Zellwand angreifen können und den Abbau der vernetzten Zellwandstruktur ermöglichen [Lynd *et al.*, 2002]. Neben Cellulasen sind dazu auch Enzyme zum Abbau anderer Polymere wie etwa Xylan (Endoxylanasen, β -Xylosidasen) oder Pektin (Endopolygalacturonasen, Exopolygalacturonasen, Pektinlyasen, Pektatlyasen und andere) notwendig [de Vries und Visser, 2001; de Vries, 2003]. Erst das Zusammenspiel dieser Enzyme macht einen vollständigen Abbau pflanzlicher Zellwände möglich.

Ist die Cellulose in der Zellwand durch die Aktivitäten der verschiedenen zellwandabbauenden Enzyme zugänglich, dann erfolgt ihr Abbau über drei Typen von Enzymen. Endocellulasen (Endo- β -1,4-glucanasen, EC 3.2.1.4) spalten Celluloseketten überwiegend an amorphen Stellen innerhalb der Kette und zersetzen das Polymer in kleinere Oligomere. Exocellulasen (Exo- β -1,4-glucanasen, Cellobiohydrolasen, EC 3.2.1.91) spalten überwiegend Cellobiose von den Kettenenden ab und können auch kristalline Bereiche angreifen. Für einen vollständigen Abbau von Cellulose sind zudem β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) nötig, die Cellobiose zu Glucose, dem Endprodukt des Celluloseabbaus, spalten [Lynd *et al.*, 2002]. Die Trennung zwischen Endo- und Exocellulasen ist nicht immer absolut eindeutig. So gibt es Untersuchungen, die bei Exocellulasen auch Endoaktivität nachgewiesen haben (vermutlich über eine zeitweise Öffnung des Tunnels des aktiven Zentrums, Kapitel 1.3.2.1) [Varrot *et al.*, 1999a/b; Zou *et al.*, 1999; Boisset *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001], während Endocellulasen vermutlich auch an Kettenenden z.B. Cellobiose freisetzen können. Endocellulasen, die innerhalb einer Kette eine Bindung spalten, könnten an dem neu entstandenen Kettenende weitere Bindungen hydrolysieren (partielle Exoaktivität), bevor sie wieder vom Substrat diffundieren [Medve *et al.*, 1998].

Einleitung

Die Fähigkeit zum Abbau von Cellulose ist taxonomisch weit verbreitet und wurde in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und einigen Tieren nachgewiesen [Tomme *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 2001; Watanabe und Tokuda, 2001]. Lediglich aus der Gruppe der *Archaea* gibt es bisher keinen Nachweis über die Fähigkeit zum Abbau von Cellulose [Lynd *et al.*, 2002].

Im Reich der Pilze findet der Abbau von Cellulose sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen statt. So bauen Pilze der Gattungen *Piromyces* und *Neocallimastix* im Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern Cellulose unter anaeroben Bedingungen ab und ermöglichen diesen Tieren damit die Verwertung von Cellulose [Eberhardt *et al.*, 2000; Rabinovich *et al.*, 2002]. Der aerobe Abbau von Cellulose findet sich sowohl in saprophytischen Pilzen wie *T. reesei* [Kubicek und Penttilä, 1998] als auch in phytopathogenen Arten wie *Phanerochaete chrysosporium* [Wymelenberg *et al.*, 2002].

Wie Pilze sind auch Bakterien in der Lage, Cellulose aerob und anaerob abzubauen. Anaerober Abbau von Cellulose ist beispielsweise in Bakterien der Gattung *Clostridium* [Han *et al.*, 2003] nachgewiesen worden, aerober Abbau findet sich zum Beispiel in Bakterien der Gattung *Cellulomonas* [Gilkes *et al.*, 1991; Stålbrand *et al.*, 1998].

Der aerobe bzw. anaerobe Abbau von Cellulose erfolgt zwar über dieselben Enzymtypen (Endo- und Exocellulasen), die Organisation dieser Enzyme unterscheidet sich jedoch erheblich. Der anaerobe Abbau verläuft über komplexe Enzymsysteme, sogenannte Cellulosome. Die Proteine kommen dabei nicht als Einzelenzyme zum Einsatz, sondern sind Teil eines größeren Proteinkomplexes. Im Cellulosom von *Clostridium thermocellum* können sich Enzyme mit unterschiedlichen katalytischen Funktionen (darunter Endo- und Exocellulasen) mit einem in der Zellwand verankerten Gerüstprotein („scaffolding protein“) verbinden. Der aerobe Abbau von Cellulose erfolgt über nicht komplexe Enzymsysteme, in denen die Enzyme einzeln agieren [Ohmiya *et al.*, 1997; Bayer *et al.*, 1998].

Enzymsysteme zum Abbau von Cellulose setzen sich aus mehreren Endo- und Exocellulasen zusammen. Das vermutlich am besten untersuchte pilzliche Enzymsystem ist das des saprophytischen Pilzes *Trichoderma reesei* (*Hypocrea*

Einleitung

jecorina). *T. reesei* besitzt mindestens zwei Exocellulasen, acht Endocellulasen und sieben β -Glucosidasen [Foreman *et al.*, 2003]. Andere pilzliche Cellulasesysteme zeigen eine ähnliche Zusammensetzung. So besitzt *Humicola insolens* mindestens zwei Exocellulasen und fünf Endoglucanasen [Schülein, 1997] und der phytopathogene Pilz *Phanerochaete chrysosporium* besitzt mindestens sieben Exocellulasen, eine Endocellulase, eine membrangebundene Cellulase und eine β -Glucosidase [Wymelenberg *et al.*, 2002]. Auch bakterielle Enzymsysteme bestehen aus mehreren Endo- und Exocellulasen. So besitzen Bakterien der Gattung *Cellulomonas* mindestens sechs Endocellulasen und eine Exocellulase und das Bakterium *Thermobifida fusca* mindestens drei Endocellulasen, zwei Exocellulasen und eine Cellulase mit beiden katalytischen Funktionen [Lynd *et al.*, 2002].

Cellulasesysteme zeigen eine höhere Aktivität gegenüber Cellulose als die Summe der Aktivitäten der Einzelenzyme, ein Phänomen, das als Synergie bezeichnet wird. Die synergistischen Effekte beziehen sich vor allem auf die Kombination von Endo- und Exocellulasen (Endo-Exo Synergie) sowie auf die Synergie zwischen bestimmten Exocellulasen (Exo-Exo Synergie) [Lynd *et al.*, 2002].

Die Endo-Exo Synergie erklärt sich aus den unterschiedlichen Angriffsorten von Endo- und Exocellulasen. Endocellulasen spalten Bindungen innerhalb einer Cellulosekette und produzieren so zusätzliche Kettenenden, an denen Exocellulasen angreifen können [Tomme *et al.*, 1995; Medve *et al.*, 1998; Boisset *et al.*, 2001].

Die Exo-Exo Synergie beruht auf unterschiedlichen Angriffsorten von Exocellulasen. Die Synergie tritt zwischen Exocellulasen auf, die Cellulose einmal vom reduzierenden (z.B. CBHI aus *T. reesei*) und einmal vom nicht reduzierenden Ende (z.B. CBHII aus *T. reesei*) her angreifen [Barr *et al.*, 1996; Nutt *et al.*, 1998]. Zudem können synergistische Effekte auch aufgrund einer partiellen Endoaktivität von Exocellulasen (wie z.B. der Exocellulase Cel6A aus *H. insolens*) auftreten [Zou *et al.*, 1999; Boisset *et al.*, 2000].

1.3.2 Aufbau, Reaktionsmechanismen und wirtschaftliche Anwendungen von Cellulasen

Cellulasen weisen einen modularen Aufbau auf. Neben der katalytischen Domäne kann ein „Carbohydrate Binding Module“ (CBM) in Cellulasen vorkommen, das über ein Linkerpeptid mit der katalytischen Domäne verbunden ist [Tomme *et al.*, 1995; Ohmiya *et al.*, 1997]. Pilzliche Cellulasen zum aeroben Abbau von Cellulose beschränken sich weitgehend auf diese Domänen, während bakterielle Cellulasen und Cellulasen anaerober Organismen zusätzliche Domänen enthalten können (eingehend beschrieben bei Tomme *et al.*, 1995 und Ohmiya *et al.*, 1997), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

1.3.2.1 Katalytische Domänen

Die katalytischen Domänen von Cellulasen werden mit denen anderer Hydrolasen anhand von Aminosäuresequenzhomologien in verschiedene Familien eingeordnet. Die Bezeichnungen der Familien bestehen aus der Abkürzung GH für „Glycoside Hydrolase“ und einer Familiennummer [Henrissat, 1991; Henrissat und Davies, 2000]. Mittlerweile sind 92 GH-Familien bekannt (Februar 2004), wobei sich Cellulasen in 14 GH-Familien finden lassen (Familien 5-10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 und 74). Diese Klassifizierung hat die alte Einteilung von Cellulasen und Xylanasen in die Familien A bis K ersetzt (Tab 1.1) [Henrissat und Bairoch, 1993]. Neben einer ähnlichen Aminosäuresequenz zeichnen sich die Mitglieder einer Familie durch eine ähnliche 3D-Struktur und den gleichen Reaktionsmechanismus (Kapitel 1.3.2.3) aus [Henrissat und Davies, 2000]. Die aktuelle Liste der GH-Familien und ihrer Mitglieder kann der CAZY-Datenbank im Internet entnommen werden (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>) [Henrissat und Davies, 2000]. Die einzelnen GH-Familien lassen sich zu übergeordneten Gruppen, den sogenannten Clans, zusammenfassen. Die Mitglieder eines Clans zeigen eine ähnliche Tertiärstruktur, konservierte katalytische Reste und den gleichen Reaktionsmechanismus. Die GH-Familien lassen sich in 14 Clans (A bis N)

Einleitung

einteilen. Clans mit Cellulasen sind Clan A (GH 5, 10, 26 und 51), Clan B (GH 7), Clan C (GH 12) und Clan M (GH 8 und 48) [Henrissat und Bairoch, 1996; Coutinho und Henrissat, 1999; CAZy-Datenbank].

Die Nomenklatur der Cellulasen und ihrer Gene wurde vereinheitlicht. So werden Cellulasen unabhängig davon, ob es sich um Endo- oder Exocellulasen handelt, mit den drei Buchstaben Cel (das dazugehörige Gen mit *cel*) abgekürzt. Es folgt die Nummer der GH-Familie und ein Buchstabe, der die Reihenfolge der Entdeckung der Cellulasen in einer Familie innerhalb einer Art angibt. So wird aus der bis dahin mit CBHI bezeichneten Cellobiohydrolase I aus *T. reesei* Cel7A. Den Bezeichnungen kann eine Abkürzung für die Art, aus der die Cellulase stammt, vorangestellt werden (z.B. Cf für *Cellulomonas fimi*) [Henrissat *et al.*, 1998].

Tab. 1.1: Zusammenhang zwischen der neuen und alten Einteilung von Cellulasen und Xylanasen in Familien (nach Henrissat und Bairoch, 1993).

neue Einteilung GH Familie	alte Einteilung	neue Einteilung GH Familie	alte Einteilung
5	A	11	G
6	B	12	H
7	C	26	I
8	D	44	J
9	E	45	K
10	F		

Durch Vergleiche von 3D-Strukturen zahlreicher katalytischer Domänen konnte ein struktureller Unterschied zwischen Exo- und Endocellulasen festgestellt werden. Während sich das aktive Zentrum bei Endocellulasen in einer offenen Grube befindet, liegt es bei Exocellulasen innerhalb eines Tunnels (Abb. 1.7). Endocellulasen greifen Cellulose innerhalb der Kette an. Dazu muss das aktive Zentrum für die Ketten frei zugänglich sein, es liegt daher in einer offenen Grube. Exocellulasen greifen Cellulose von den Kettenenden her an. Das aktive Zentrum in einem Tunnel erlaubt den Eintritt eines Cellulosemoleküls in das aktive Zentrum nur

Einleitung

vom Kettenende her [Teeri, 1997; Varrot *et al.*, 1999a/b; Davies *et al.*, 2000; Munoz *et al.*, 2001; Sandgren *et al.*, 2001].

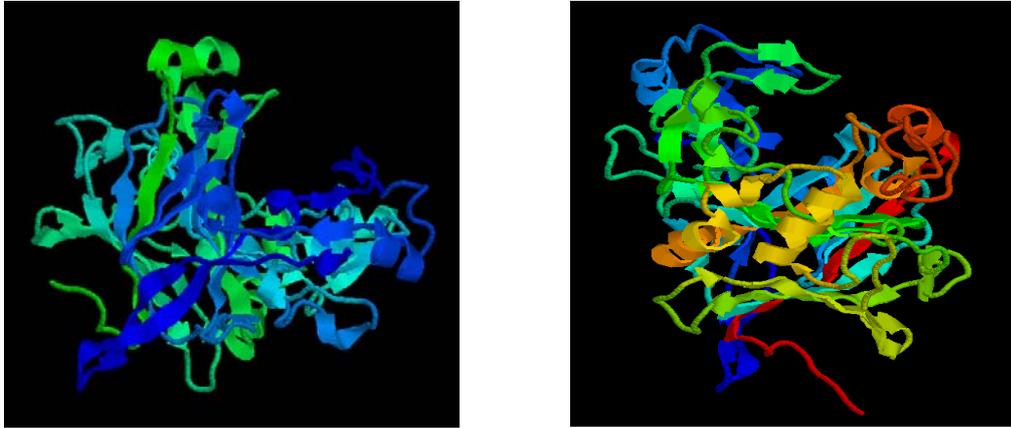


Abb. 1.7: Katalytische Domäne einer Endocellulase (links, aktives Zentrum in einer offenen Grube) und einer Exocellulase (rechts, aktives Zentrum in einem Tunnel). Quelle: eigene Abbildungen.

1.3.2.2 „Carbohydrate binding modules“, Linker und Signalpeptide

Das „Carbohydrate Binding Module“ (CBM) ist neben der katalytischen Domäne die zweite Domäne in vielen Cellulasen [Linder und Teeri, 1997]. Sie kann im Protein sowohl N- als auch C-Terminal vorkommen oder auch ganz fehlen [Ohmiya *et al.*, 1997]. CBMs können an verschiedene Polymere wie Cellulose (früher „cellulose binding domain“ (CBD) genannt), Chitin oder Stärke binden und werden in über 30 Familien eingeordnet [CAZy-Datenbank]. Die ca. 33-40 Aminosäuren langen pilzlichen CBMs finden sich ausschließlich in der Familie I, die anderen Familien enthalten überwiegend bakterielle CBMs [Linder und Teeri, 1997]. CBMs von Cellulasen binden die Enzyme an ihr Substrat Cellulose und erhöhen so die Konzentration des Enzyms auf dem Substrat. Durch die Bindung des CBM kann die Hydrolyse von Cellulosemikrofibrillen durch das Herauslösen von Cellulosefragmenten erleichtert werden. Zudem wird angenommen, dass CBMs für

die Prozessivität von Exocellulasen von Bedeutung sind [Linder und Teeri, 1997; Levy *et al.*, 2002; Lynd *et al.*, 2002].

CBMs sind über einen Linker mit der katalytischen Domäne verbunden. Der Linker ist in pilzlichen Cellulasen glykosyliert und besitzt einen hohen Anteil an Prolin-, Threonin- und Serinresten. Er sorgt bei der Hydrolyse von Cellulose vermutlich für eine ausreichende Flexibilität zwischen dem gebundenen CBM und der katalytischen Domäne [Srisodsuk *et al.*, 1993; Tomme *et al.*, 1995; Receveur *et al.*, 2002].

Cellulose ist ein wasserunlösliches Polymer und kann für den Abbau durch Cellulasen nicht in die Zellen der Organismen transportiert werden. Cellulasen müssen daher in den Apoplasten sezerniert werden, um an ihr Substrat zu gelangen [Béguin und Aubert, 1994]. Pilzliche Cellulasen tragen zu diesem Zweck ein 15-30 Aminosäuren langes Signalpeptid, das für den Export des Enzyms sorgt und bei diesem Prozess abgespalten wird [Heijne, 1985; Nielsen *et al.*, 1997].

1.3.2.3 Reaktionsmechanismen

Cellulasen hydrolysieren die glycosidischen Bindungen in Cellulose entweder unter Beibehaltung („retaining“) oder Inversion („invertig“) der Konfiguration des anomeren Zentrums.

Invertierende Cellulasen spalten die Bindungen in einem sogenannten „single displacement“ Mechanismus. Ein nukleophiler Angriff eines Wassermoleküls am anomeren Zentrum, unterstützt durch die Deprotonierung des Wassermoleküls (Basenkatalyse) sowie einer Protonierung (Säurekatalyse) der abgehenden Gruppe, führt zur Spaltung der Bindung (Abb. 1.8) [Varrot *et al.*, 1999a/b; Becker *et al.*, 2000]. Cellulasen mit diesem Reaktionsmechanismus finden sich in den GH-Familien 6, 8, 9, 44, 45, 48 und 74 [Bayer *et al.*, 1998; CAZy-Datenbank].

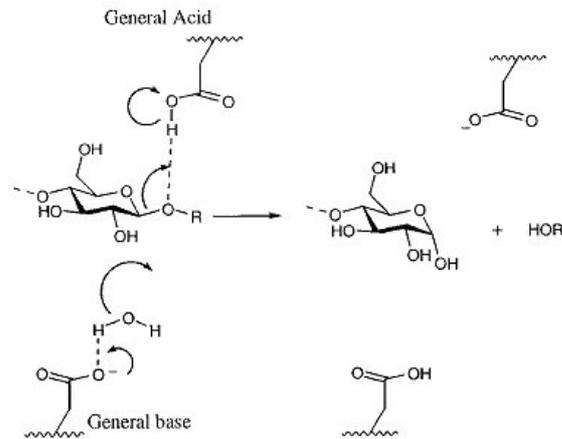


Abb. 1.8: „Inverting displacement“ Mechanismus von Cellulasen. Quelle: Varrot *et al.*, 1999a.

Cellulasen, die die Konfiguration des anomeren Zentrums nicht ändern („retaining“), spalten die glycosidischen Bindungen nach einem als „double displacement“ bezeichneten Mechanismus. Bei diesem Mechanismus kommt es zur Bildung eines Glycosyl-Enzym Zwischenproduktes (Abb. 1.9). Die abgehende Gruppe wird von einer als Säure fungierenden katalytischen Aminosäure protoniert und dabei von einer zweiten, als Nukleophil wirkenden katalytischen Aminosäure unterstützt. Es bildet sich über ein Oxocarboniumion das Glycosyl-Enzym Zwischenprodukt. Der im ersten Schritt als Säure fungierende Rest deprotoniert nun als Base ein Wassermolekül, welches als Nukleophil das C1-Atom angreift. Über die erneute Bildung eines Oxocarboniumions wird das kovalente Glycosyl-Enzym Zwischenprodukt aufgelöst [Sulzenbacher *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1998]. Cellulasen mit diesem Reaktionsmechanismus finden sich in den GH-Familien 5, 7, 10, 12, 26 und 51 [Bayer *et al.*, 1998].

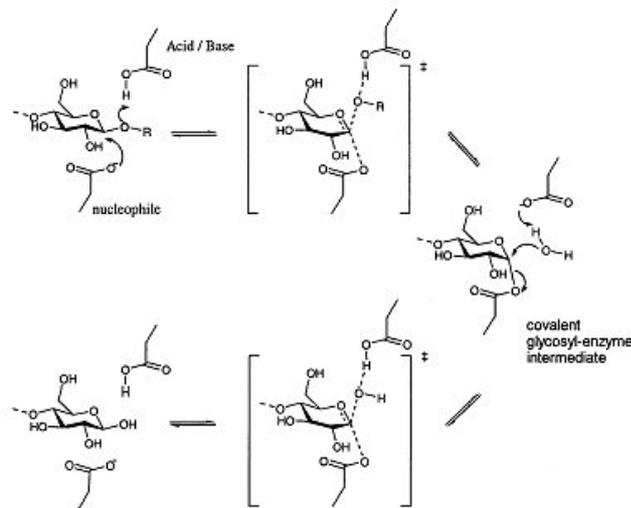


Abb.1.9: „Double displacement“ Mechanismus von Cellulasen. Quelle: Mackenzie *et al.*, 1998.

Als katalytische Aminosäuren konnten für beide Reaktionsmechanismen Aspartat- und Glutamatreste identifiziert werden [Béguin und Aubert, 1994; Mackenzie *et al.*, 1998; Varrot *et al.*, 1999a/b; Becker *et al.*, 2001]. Nach welchem Reaktionsmechanismus Cellulasen der GH-Familie 61 glycosidische Bindungen spalten, ist bisher nicht bekannt.

1.3.2.4 Anwendungen von Cellulasen

Neben ihrer Verwendung in der Forschung werden Cellulasen auch industriell eingesetzt. Cellulose ist als massenhaft verfügbarer, nachwachsender Rohstoff ideal als Ausgangsprodukt für die Herstellung von Ethanol geeignet, das als Kraftstoffalternative zu den fossilen Brennstoffen eingesetzt werden könnte. Die Produktion von Ethanol läuft über den Abbau von Cellulose durch Cellulasen zu Glucose, die dann von Hefen zu Ethanol fermentiert wird. Zurzeit ist dieses Verfahren noch nicht wirtschaftlich, was vor allem an den hohen Kosten für die benötigten Enzyme liegt.

In der Textilindustrie werden Cellulasen beim Bearbeiten von Jeansstoffen („stonewashing“) und beim Glätten von Stoffen („defuzzing“) verwendet.

In der Nahrungs- und Futtermittelindustrie finden Cellulasen als Zusätze von Tierfutter (leichtere Verdaubarkeit von Pflanzenmaterial), Säften und bei der Teigherstellung von Backwaren Verwendung.

In der Papierindustrie finden Cellulasen Verwendung bei der Entwässerung von Papier und beim Papierrecycling (Entfärbung). Neben Cellulasen können auch „Carbohydrate binding modules“ industriell genutzt werden. Die Zugabe von CBMs der Familie III bei der Papierherstellung verbessert beispielsweise die mechanischen Eigenschaften des Papiers [Levy *et al.*, 2002].

1.3.3 Zellwandabbauende Enzyme als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren

Cellulasen sind aus zahlreichen phytopathogenen Pilzen bekannt, wie eine Auswahl an Beispielen zeigt: *Cochliobolus carbonum* [Sposato *et al.*, 1995; Ahn *et al.*, 2001], *Phanerochaete chrysosporium* [Wymelenberg *et al.*, 2002], *Fusarium oxysporum* [Sheppard *et al.*, 1994; Christakopoulos *et al.*, 1995a/b], *Macrophomina phaseolina* [Wang und Jones, 1995] und *Leptosphaeria maculans* [Sexton *et al.*, 2000]. Zusammen mit anderen zellwandabbauenden Enzymen sind Cellulasen am Abbau pflanzlicher Zellwände beteiligt. Trotz der Präsenz von Cellulasen und anderen zellwandabbauenden Enzymen in zahlreichen phytopathogenen Pilzen wird angenommen, dass einzelne dieser Enzyme aufgrund ihrer Redundanz keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Virulenz bzw. Pathogenität haben [Annis und Goodwin, 1997; de Lorenzo *et al.*, 1997; Idnurm und Howlett, 2001; Lebeda *et al.*, 2001]. Zahlreiche Studien mit phytopathogenen Pilzen, in denen die Bildung einzelner oder mehrerer zellwandabbauender Enzyme in der Regel über Genausschaltungen verhindert wurde, belegen dies. Keine Veränderung der Virulenz konnte beim Verlust von Cellulasen in *C. carbonum* [Sposato *et al.*, 1995; Ahn *et al.*, 2001], Xylanasen in *F. oxysporum* [Gomez-Gomez *et al.*, 2002], *Magnaporthe grisea* [Wu *et al.*, 1997] und *C. carbonum* [Apel-Birkhold und Walton, 1996] oder einer Endopolygalacturonase in *C. carbonum* [Scott-Craig *et al.*, 1990] beobachtet werden. In *C. carbonum*, *F. oxysporum* und *M. grisea* wurden mehrere Gene parallel

ausgeschaltet, ohne dass eine Veränderung der Virulenz beobachtet werden konnte [Apel-Birkhold und Walton, 1996; Wu *et al.*, 1997; Gomez-Gomez *et al.*, 2002]. Es gibt nur wenige Beispiele (betreffend vor allem Cutinasen und pektinabbauende Enzyme), wo der Verlust eines zellwandabbauenden Enzyms Auswirkungen auf die Virulenz bzw. Pathogenität eines Pilzes hatte [Annis und Goodwin, 1997; Idnurm und Howlett, 2001]. Nicht so klar ist die Rolle zellwandabbauender Enzyme dagegen in phytopathogenen Bakterien. In einigen Fällen konnte hier eine Abnahme der Virulenz bzw. Pathogenität nach Ausschalten eines zellwandabbauenden Enzyms nachgewiesen werden [Annis und Goodwin, 1997; Jahr *et al.*, 2000].

1.4 Regulation von Cellulasen

Die Expression von Cellulasen erfolgt in der Regel nicht konstitutiv, sondern ist abhängig von dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit bestimmter Induktoren oder Repressoren, die im folgenden Kapitel (1.4.1) beschrieben werden. Diese Induktoren und Repressoren wirken über eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (Kapitel 1.4.2) entweder induzierend oder reprimierend auf die Transkription von Cellulasegenen.

1.4.1 Induktoren und Repressoren der Expression von Cellulasen

Die Transkription von Cellulasegenen wird bei Anwesenheit von Induktoren induziert und bei Anwesenheit von Repressoren reprimiert. Eine Induktion konnte vor allem durch Cellulose, Cellobiose und Sophorose (β -1,2-Glucobiose), aber auch durch L-Sorbose, Xylan und einige andere Substrate erreicht werden [Margolles-Clark *et al.*, 1997; Nogawa *et al.*, 2001; Suto und Tomita, 2001]. Es ist bisher nicht eindeutig geklärt, welches Molekül die Induktion tatsächlich auslöst (natürlicher Induktor). Cellulose kommt als unlösliches Polymer nicht als natürlicher Induktor in

Frage. Daher sind lösliche Abbauprodukte (Cellobiose) oder aus ihnen gebildete Oligomere (Sophorose kann durch Transglykosylierung von Cellobiose durch β -Glucosidasen entstehen) gute Kandidaten für den natürlichen Induktor. Die Induktoren werden vermutlich durch Cellulasen freigesetzt, die entweder konstitutiv oder durch die gelegentliche Expression nicht induzierter bzw. reprimierter Gene gebildet werden. Eine Repression der Transkription von Cellulasegenen kann bei Anwesenheit von Glucose beobachtet werden. Die Regulation von Cellulasen findet auf Transkriptionsebene statt und wird durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotoren gesteuert [Suto und Tomita, 2001; Lynd *et al.*, 2002; Mach und Zeilinger, 2003; Schmoll und Kubicek, 2003].

1.4.2 Transkriptionsfaktoren

Die Regulation von Cellulasegenen basiert auf der Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren mit den Promotoren von Cellulasegenen. Die Transkriptionsfaktoren mit Beteiligung an der Regulation von Cellulasegenen in Pilzen sollen in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden (CRE, Kapitel 1.4.2.1; ACEI, Kapitel 1.4.2.2; ACEII, Kapitel 1.4.2.3; XlnR, Kapitel 1.4.2.4 und HAP, Kapitel 1.4.2.5).

1.4.2.1 Transkriptionsfaktor CRE

Die durch Glucose (und andere leicht zu metabolisierende Zucker) vermittelte Repression von Genen, die Enzyme zum Abbau komplexer Kohlenstoffquellen wie Cellulose kodieren, wird als „carbon catabolite repression“ bezeichnet [Schmoll und Kubicek, 2003]. Dass es sich dabei um eine Repression und nicht um eine fehlende Induktion handelt, belegen Versuche, in denen die Transkription verschiedener Cellulasegene in induzierten Kulturen nach Zugabe von Glucose eingestellt wurde [Ilmen *et al.*, 1997]. CRE-Transkriptionsfaktoren sind an der Transkriptionsrepression durch Glucose beteiligt und aus verschiedenen pathogenen und nicht pathogenen Pilzen bekannt (*T. reesei* und *T. harzianum* [Ilmen *et al.*,

1996], *Humicola grisea* [Takashima *et al.*, 1998a], *Sclerotinia sclerotiorum* [Vautard-Mey *et al.*, 1999], *Gibberella fujikuroi* und *Botrytis cinerea* [Tudzynski *et al.*, 2000], *Aspergillus nidulans* [Dowzer und Kelly, 1991], weitere Beispiele finden sich bei Felenbok *et al.*, 2001). Die Bindung an DNA wird über zwei Zink-Finger Motive des Cys₂His₂ Typs vermittelt, die im Fall von *A. nidulans* an die Konsensussequenz SYGGRG (S = G/C, Y = C/T, R = A/G) binden [Felenbok *et al.*, 2001]. Bindestellen für CRE Faktoren konnten bereits in mehreren Promotoren von Cellulasegenen gefunden werden (*cbh1* aus *T. reesei* [Takashima *et al.*, 1996a], *eg-1* und *cbh-1* aus *H. grisea* [Takashima *et al.*, 1996b] und *eglA*, *eglB*, *cbhA* und *cbhB* aus *A. nidulans* [Chikamatsu *et al.*, 1999; Lockington *et al.*, 2002]). Für *T. reesei* konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei CRE1 um ein Phosphoprotein handelt. Die Phosphorylierung von Ser²⁴¹ war für die Bindung an die DNA notwendig [Cziferszky *et al.*, 2002]. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich der CRE1-Faktor des phytopathogenen Pilzes *Sclerotinia sclerotiorum* nur bei Anwesenheit von Glucose im Zellkern finden ließ. War keine Glucose im Kulturmedium vorhanden, konnte CRE1 nur im Cytoplasma lokalisiert werden [Vautard-Mey *et al.*, 1999].

1.4.2.2 Transkriptionsfaktor ACE1

Der Transkriptionsfaktor ACE1 („activator of cellulase expression“) wurde erstmals im Jahr 2000 aus *T. reesei* isoliert. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor mit drei Zink-Finger Motiven (Cys₂His₂-Typ), die für die Bindung des Faktors an DNA verantwortlich sind [Saloheimo *et al.*, 2000]. Die durchschnittlich 30 Aminosäuren lange DNA bindende Zink-Finger Domäne des Typs Cys₂His₂ faltet sich zu einer fingerähnlichen Tertiärstruktur (Abb. 1.10). Über zwei Cystein- und zwei Histidinreste wird ein Zinkion gebunden und die Struktur so stabilisiert. Zink-Finger Motive kommen meistens in Mehrzahl in einem Faktor vor. Eine genauere Beschreibung von Zink-Finger Motiven ist bei Wolfe *et al.* [1999] zu finden.

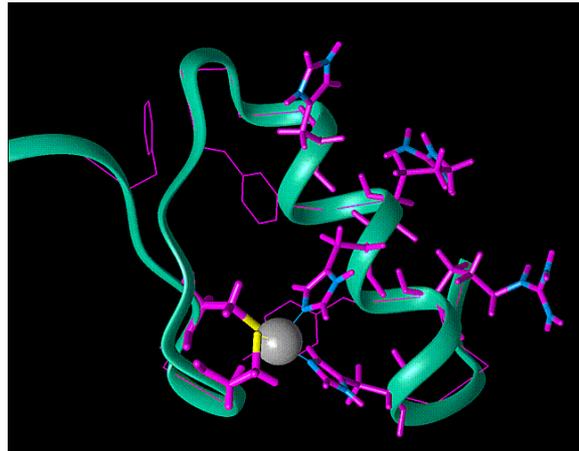
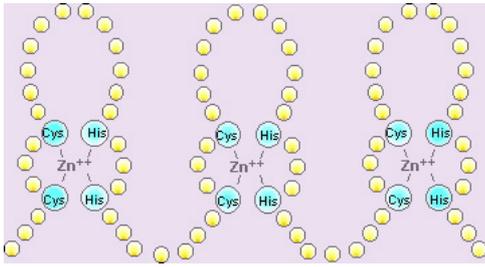


Abb. 1.10: Zink-Finger Motiv des Cys₂His₂ Typs. Links schematische Abbildung, rechts 3D-Modell einer Zink-Finger Domäne. Quellen: Abbildung links: Guasconi *et al.*, 2002; Abbildung rechts: „NMR solution structure of a Zinc-finger derived from ADR1“, <http://clara.bmsc.washington.edu/~klevit/hyre.html>.

Die Bindesequenz des ACEI-Faktors (AGGCAAA Motive und einige AGGCA Motive, gefolgt von einer A-T reichen Region) wurde ermittelt und die Bindung des ACEI-Faktors an diese Bindesequenz im Promotor des Cellobiohydrolase I Gens (*cbh1*) aus *T. reesei* nachgewiesen. Die Ausschaltung des *ace1*-Gens in *T. reesei* ($\Delta ace1$) führte zu einem verlangsamten Wachstum auf einem festen Medium mit Cellulose, während das Wachstum auf einem festen Medium mit Glucose nicht verändert war [Saloheimo *et al.*, 2000]. Die nach den ersten Versuchen angenommene Rolle des ACEI-Faktors als Aktivator der Transkription von Cellulasegenen wurde in einer folgenden Untersuchung relativiert [Aro *et al.*, 2003]. Untersuchungen mit der bereits bei Saloheimo *et al.* [2000] verwendeten $\Delta ace1$ -Mutante in flüssigen Medien zeigten, dass das Wachstum in cellulosehaltigen Medien im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Zudem konnte eine erhöhte Transkription von Cellulasegenen (Cellobiohydrolasegene *cbh1* und *cbh2*, Endoglucanasegene *egl1* und *egl2*) und Xylanasegenen (*xyn1* und *xyn2*) in der $\Delta ace1$ -Mutante bei Wachstum in cellulosehaltigen Medien nachgewiesen werden, was auf eine Rolle des ACEI-Faktors als Repressor der Transkription von Cellulasegenen schließen lässt [Aro *et al.*, 2003]. Ob es sich bei ACEI um einen Repressor oder Aktivator von Cellulase- und Xylanasegenen handelt, ist nicht abschließend geklärt.

1.4.2.3 Transkriptionsfaktor ACEII

Der Transkriptionsfaktor ACEII wurde 2001 erstmalig in *T. reesei* beschrieben [Aro *et al.*, 2001]. Es handelt sich um einen aktivierenden Transkriptionsfaktor mit einer „zinc binuclear cluster“ DNA Bindedomäne (für nähere Informationen zur „zinc binuclear cluster“ Domäne siehe Todd und Andrianopoulos, 1997). Bindesequenzen des ACEII-Faktors (GGCTAATAA) finden sich in den Promotoren der beiden Cellobiohydrolasegene *cbh1* und *cbh2*, der beiden Endoglucanasegene *egl1* und *egl5* sowie dem Promotor des Xylanasegens *xyn1* aus *T. reesei*. Die Deletion des *ace2*-Gens in *T. reesei* führte zu einer Abnahme der Expression von Cellulasegenen (Cellobiohydrolasegene *cbh1* und *cbh2*, Endoglucanasegene *egl1* und *egl2*) und eines Xylanasegens (*xyn2*). Ein paralleles Ausschalten der Faktoren ACEI und ACEII führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Expression von Cellulasegenen gegenüber der Deletion von ACEI [Aro *et al.*, 2003].

1.4.2.4 Transkriptionsfaktor XlnR

Der erste Transkriptionsaktivator von Genen extrazellulärer Enzyme war der Transkriptionsfaktor XlnR aus *Aspergillus niger*. XlnR gehört zur Familie der „zinc binuclear cluster“ Transkriptionsfaktoren und war zunächst als Aktivator von Genen für Enzyme zum Xylanabbau identifiziert worden [van Peij *et al.*, 1998a]. In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass auch Gene von Endocellulasen (Endocellulasegene *eglA* und *eglB*) [van Peij *et al.*, 1998b] und Exocellulasen (Exocellulasegene *cbhA* und *cbhB*) [Gielkens *et al.*, 1999] in *A. niger* über den Aktivator XlnR reguliert werden. In *Aspergillus oryzae* konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass XlnR sowohl Gene für xylanabbauende als auch celluloseabbauende Enzyme reguliert [Marui *et al.*, 2002].

1.4.2.5 Transkriptionsfaktoren HAP

Im Promotor des Gens der Cellobiohydrolase II (*cbh2*) aus *T. reesei* konnte eine Nukleotidsequenz (CAE für „*cbh2* activating element“, ATTGGGTAATA, bestehend aus dem CCAAT (=ATTGG) Motiv auf dem template Strang und dem GTAATA Motiv auf dem kodierenden Strang) gefunden werden, die für die Induktion des *cbh2*-Gens erforderlich ist [Zeilinger *et al.*, 1998]. Die CCAAT Box ist in zahlreichen Eukaryonten als Promotormotiv gefunden worden und für die Regulation der zugehörigen Gene von Bedeutung (darunter das *cbh2*-Gen und zwei Xylanasegene (*xyn1* und *xyn2*) aus *T. reesei*). Die Proteine, die an die CCAAT Box binden, wurden erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und als Hap Komplex bezeichnet, bestehend aus den drei DNA bindenden Proteinen Hap2p, Hap3p und Hap5p sowie einem Hap4p Protein, das mit dem Hap2p/3p/5p Komplex interagiert. In *A. nidulans* wird die CCAAT Box von einem Proteinkomplex (bestehend aus den Proteinen HAPB, HAPC und HAPE) gebunden, der große Ähnlichkeit zum HAP Komplex aus *S. cerevisiae* besitzt [Brakhage *et al.*, 1999]. In *T. reesei* konnten ebenfalls Hap Proteine identifiziert werden (HAP2/3/5), die an die CCAAT Box des CAE-Elements im *cbh2* Promotor binden und vermutlich an der Regulation der Cellobiohydrolase II beteiligt sind [Zeilinger *et al.*, 2001].

1.5 Ziele der Arbeit

Das Phytopathogen *F. graminearum* ist weltweit als Krankheitserreger von Weizen, Mais und anderen Gräsern bekannt. Die mit dem Ausbruch der Krankheit verbundenen Ernteauffälle und die Kontaminationen der Ernten mit Mycotoxinen führen jährlich zu erheblichen ökonomischen Verlusten. Eine Bekämpfung von *F. graminearum* ist bisher nur eingeschränkt möglich und mit erheblichen Kosten verbunden.

Trotz der wirtschaftlichen Schäden die *F. graminearum* regelmäßig verursacht, ist bisher erst wenig über das Pathogen und seine Infektionsstrategien bekannt. Zu den

genauer untersuchten Aspekten zählt die Biosynthese von Mycotoxinen, die mit der Virulenz des Pilzes in Verbindung gebracht werden konnte [Proctor *et al.*, 1995, 1997 und 2002; Desjardins *et al.*, 1996 und 2000] sowie die Untersuchungen zu Pektinasen [Conze, 2003] und Proteasen [Hellweg, 2003], die erst kürzlich in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Weitere Untersuchungen sind dringend erforderlich, um durch ein besseres Verständnis dieses wichtigen Phytopathogens neue Strategien zu seiner Bekämpfung ableiten zu können.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Abbau von Cellulose in pflanzlichen Zellwänden und der Regulation von Cellulasegenen in *F. graminearum*.

Zunächst galt es, das Cellulasesystem des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* auf genetischer Ebene zu untersuchen. Bisher waren aus *F. graminearum* keine Cellulasegene bekannt (einzige Ausnahme ist ein kurzes Fragment eines Cellulasegens, Hatsch *et al.*, 2002).

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, Cellulasegene im Genom von *F. graminearum* zu identifizieren und zu sequenzieren. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Transkription der so identifizierten Cellulasegene einer Regulation unterliegt oder konstitutiv erfolgt. Dazu wird die Transkription von Cellulasegenen beim Wachstum des Pilzes mit verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht.

Zellwandabbauende Enzyme wie Cellulasen sind für die Überwindung pflanzlicher Zellwände von Bedeutung und könnten daher bei der Infektion von Pflanzen eine Rolle spielen. Um eine mögliche Beteiligung von Cellulasen am Infektionsprozess von *F. graminearum* bei Weizen nachzuweisen, soll die Transkription von Cellulasegenen in infizierten Weizenähren untersucht werden.

Die Regulation der Expression zellwandabbauender Enzyme erfolgt überwiegend auf Transkriptionsebene. Es sind bereits mehrere Transkriptionsfaktoren aus verschiedenen Pilzen bekannt, die an dieser Regulation beteiligt sind. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht darin, Gene von Transkriptionsfaktoren zur Regulation von Cellulasegenen im Genom von *F. graminearum* zu identifizieren und zu sequenzieren.

Einleitung

Transkriptionsfaktoren regulieren meistens die Transkription einer ganzen Reihe von Genen. Auch für die an der Regulation von Cellulasegenen beteiligten Transkriptionsfaktoren konnte eine Beteiligung an der Regulation von weiteren Genen, die häufig ebenfalls Gene von Enzymen zum Zellwandabbau waren, nachgewiesen werden.

Aufgrund ihres Einflusses auf die Expression zahlreicher Gene von Enzymen mit möglichem Einfluss auf die Virulenz bzw. Pathogenität von phytopathogenen Pilzen, soll die Rolle des Transkriptionsfaktors ACEI in *F. graminearum* genauer untersucht werden.

Ziel dieser Untersuchung ist es, den aus *T. reesei* bekannten Transkriptionsfaktor ACEI in *F. graminearum* in Bezug auf seine Rolle als Aktivator oder Repressor der Transkription von Cellulasegenen zu beschreiben. Dazu wird das *aceI*-Gen in *F. graminearum* ausgeschaltet ($\Delta aceI$) und das Wachstum der Mutante mit dem Wachstum des Wildtyps auf Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen verglichen.

Weiterhin wird untersucht, ob das Ausschalten des Transkriptionsfaktors ACEI einen Einfluss auf die Pathogenität oder Virulenz von *F. graminearum* hat. Dazu werden Weizenähren mit der $\Delta aceI$ -Mutante oder dem Wildtyp von *F. graminearum* infiziert und deren Virulenz verglichen.

2 Material und Methoden

Häufig vorkommende Hersteller von Geräten und Chemikalien werden an den entsprechenden Stellen als Abkürzungen angegeben, die in der folgenden Tabelle (Tab. 2.1) den vollständigen Bezeichnungen der Hersteller zugeordnet werden können.

Tab. 2.1: Im Text verwendete Abkürzungen häufig vorkommender Hersteller von Geräten und Chemikalien.

Abkürzung	Hersteller
Roth	Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe, Deutschland
Merck	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Duchefa	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Deutschland
BioRad	BioRad Life Sciences, München, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MWG	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Roche	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
ABgene	ABgene, Epsom, United Kingdom
NEB	New England Biolabs, Beverly, USA
Beckman	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Promega	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser angesetzt (A. bidest).

2.1 Kultivierung von *E. coli*, *F. graminearum* und *T. aestivum*

2.1.1 Stammhaltung von *Fusarium graminearum* K59

Der verwendete Stamm *F. graminearum* K59 wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Frau Dr. U. Steiner von der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Arbeiten mit diesem Stamm durchgeführt, der im folgenden lediglich *F. graminearum* genannt wird.

Die Stammhaltung von *F. graminearum* erfolgte nach Pontecorvo [1953] und Conze [2000] auf CM-Agarplatten (Medium s.u.) bei 28 °C im Dunkeln. Ein Mycelstück (ca. 0,25 cm²) des Pilzes wurde alle acht Wochen auf frische CM-Platten überimpft.

Zusammensetzung CM (1 l): 0,2 % Pepton tryptisch verdaut (Roth), 0,1 % Caseinhydrolysat vitaminfrei (Merck), 0,1 % Hefeextrakt (Roth), 0,5 % Glucose (Merck), 50 ml Salzlösung (10,4 g/l KCl (Roth), 10,4 g/l MgSO₄ X 7 H₂O (Roth), 30,4 g/l KH₂PO₄ (Merck)), 2 ml Spurenelemente (1 g/l FeSO₄ X 7 H₂O (Roth), 0,15 g/l CuSO₄ X 5 H₂O (Roth), 1,61 g/l ZnSO₄ X 7 H₂O (Roth), 0,1 g/l MnSO₄ X H₂O (Merck), 0,1 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ X 4 H₂O (Roth)) und 1,5 ml Vitaminlösung (0,5 g/l Biotin (Sigma), 50 g/l Nicotinsäure (Duchefa), 16 g/l para-Aminobenzoesäure (Sigma) und 20 g/l Pyridoxinhydrochlorid (Duchefa)). Der pH-Wert des Mediums wurde auf 5,8 - 6,0 mit NaOH / HCl eingestellt. Für die Kultivierung auf Platten wurde dem Medium 1,5 % Agar-Agar (Roth) zugegeben.

Bei Versuchen mit Selektionsmarker wurde den Medien Hygromycin B (Duchefa) mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Zugabe erfolgte in Flüssigmedien direkt vor der Animpfung, bei festen Medien vor dem Gießen der Platten.

2.1.2 Induktionsmedien für *F. graminearum*

Für die Induktionsversuche wurde der Pilz zunächst 72 h in flüssigem CM (Kapitel 2.1.1) angezogen (120 rpm, 28 °C, im Dunkeln). Dazu wurde ein bewachsenes Mycelstück (ca. 0,25 cm²) der Stammkulturplatte in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml flüssigem CM gegeben. Nach drei Tagen wurde das gewachsene Mycel mit einer Pinzette steril in einen weiteren Erlenmeyerkolben mit 50 ml Minimalmedium (Medium s.u.) überimpft und weiter bei 28 °C, 120 rpm im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde vor dem Überimpfen am Rand des Erlenmeyerkolbens möglichst alles CM aus dem Mycel gedrückt.

Bei Induktionsversuchen auf festen Minimalmedien wurde jeweils ein Mycelstück einer Stammkulturplatte (ca. 0,25 cm², Kapitel 2.1.1) in die Mitte der zu beimpfenden Agarplatten gelegt. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C im Dunkeln.

Zusammensetzung Minimalmedium (1 l) nach Conze [2000]: 50 ml Salzlösung (Kapitel 2.1.1), 2 ml Spurenelemente (Kapitel 2.1.1), 1,5 ml Vitamine (Kapitel 2.1.1), 0,1 % Pepton tryptisch verdaut (Roth), 0,1 % Caseinhydrolysat vitaminfrei (Merck) und 0,5 % einer Kohlenstoffquelle. Als Kohlenstoffquellen wurden Cellulose Typ 20 (Sigma), Sorbitol (Roth), Glucose (Merck), Weizenzellwand (Wiethölter *et al.*, 2003) oder Xylan aus Haferspelzen (Roth) eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit NaOH / HCl auf 5,8 - 6,0 eingestellt. Für die Kultivierung auf Platten wurde dem Medium 1,5 % Agar-Agar (Roth) zugegeben.

Bei Versuchen mit Selektionsmarker wurde den Medien Hygromycin B (Duchefa) mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Zugabe erfolgte in Flüssigmedien direkt vor der Animpfung, bei festen Medien vor dem Gießen der Platten.

2.1.3 Ernte des Mycels

Das in Flüssigmedium angewachsene Mycel wurde steril geerntet. Dazu wurden sterile Filter (Nalgene MF75™, 250 ml, Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Das Mycel wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe vom Medium getrennt, trocken gesaugt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach dem Einfrieren wurde das Mycel in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Die Lagerung des Mycelpulvers erfolgte bei -80 °C .

2.1.4 Sporenproduktion von *F. graminearum*

Für die Infektion von Weizenpflanzen und die Transformation des Pilzes wurden Sporen von *F. graminearum* benötigt. Dazu wurden Sporen (ca. $1 \cdot 10^6$) oder ein Mycelstück (ca. $0,25\text{ cm}^2$) in einem Sporulationsmedium (Medium s.u.) für 14 Tage angezogen (28 °C , 120 rpm, im Dunkeln). Es wurden pro Isolation vier Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Sporulationsmedium angesetzt.

Zusammensetzung Sporulationsmedium (1 l) [Booth, 1971]: 1,5 % Carboxymethylcellulose (Roth), 1 g NH_4NO_3 (Merck), 1 g KH_2PO_4 (Merck), 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{ H}_2\text{O}$ (Merck) und 1 g Hefeextrakt (Roth).

Zur Ernte der Sporen wurde das Medium der vier Ansätze durch ein Metallsieb (Porengröße 0,25 mm) filtriert. Die Sporen wurden dabei zunächst grob vom Mycel getrennt und befanden sich nach der Filtration im Filtrat. Das Filtrat wurde erneut filtriert (Metallsieb 0,05 mm Porengröße) und die Sporen von noch in der Flüssigkeit verbliebenen Mycelresten getrennt. Dieses zweite Filtrat mit den Sporen wurde 5 min bei 1430 g im Ausschwingrotor (Beckman Allegra 6KM Centrifuge) in vier Fraktionen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die vier Sporenpellets wurden vereinigt und weitere drei mal mit 40 ml sterilem A. bidest gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert.

Material und Methoden

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Sporen in 500 µl sterilem A. bidest aufgenommen und bei 4 °C für maximal 14 Tage gelagert.

2.1.5 Stammhaltung von *E. coli* DH10B

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* Stamm DH10B (Invitrogen) verwendet. Die Stammhaltung der Bakterien erfolgte auf festem LB-Medium (Medium s.u.). Die Bakterien wurden alle vier Wochen auf frische LB-Agarplatten überimpft und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Zusammensetzung LB-Medium (1 l) nach Luria *et al.* [1960]: 10 g Pepton tryptisch verdaut (Roth), 5 g Hefeextrakt (Roth), 5 g NaCl (Roth). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Für festes Medium wurden 1,5 % Agar-Agar (Roth) zugegeben.

2.1.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen erfolgte verändert nach Sambrook *et al.* [1989]. Eine Einzelkolonie von *E. coli* wurde in 10 ml flüssiges LB-Medium (Kapitel 2.1.5) überimpft und über Nacht bei 37 °C, 120 rpm inkubiert. 5 ml dieser Kultur wurden in 500 ml auf 37 °C vorgewärmtes TYP-Medium (Medium s.u.) überimpft und bei 37 °C, 120 rpm inkubiert. Die Inkubation wurde fortgeführt, bis die optische Dichte der Kultur einen Wert zwischen 0,6 und 0,9 im Vergleich zu sterilem TYP-Medium erreicht hatte (Eppendorf BioPhotometer). Die gewachsenen Zellen wurden 15 min im Eis gekühlt und anschließend 12 min bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml sterilem A. bidest (eiskalt) resuspendiert, auf 500 ml mit sterilem A. bidest (eiskalt) aufgefüllt und bei 4 °C und 4000 g für 12 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Am Ende eines

Material und Methoden

weiteren Waschschrilles wurde das Pellet in 25 ml 10 %igem Glycerin (Roth) resuspendiert, in ein Polypropylen Gefäß (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) überführt und bei 4 °C und 4000 g für 12 min zentrifugiert. Die pelletierten *E. coli* Zellen wurden in 1,5 ml 10 %igem Glycerin (Roth) resuspendiert und in Portionen von je 100 µl in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Zusammensetzung TYP-Medium (1 l) [Ward *et al.*, 1999]: 16 g Pepton tryptisch verdaut (Roth), 16 g Hefeextrakt (Roth), 5 g NaCl (Roth) und 2,5 g K₂HPO₄ (Merck).

2.1.7 Anzucht von Weizen (*Triticum aestivum* L.)

Weizenpflanzen der Sorte Bobwhite wurden freundlicherweise von Eva Aguado Roco nach einem Protokoll von Stoger *et al.* [1999] angezogen.

Die Weizensamen wurden für 20 min oberflächensterilisiert (6 % Natriumhypochlorid (Roth) und 0,5 % Triton X 100 (Roth)) und anschließend 5 X mit A. bidest gewaschen. Die Samen wurden einzeln in Pflanztöpfe ausgepflanzt und bis zur Blüte (nach 6-8 Wochen) in einem Gewächshaus angezogen.

2.1.8 Infektion von Weizenpflanzen mit *F. graminearum*

Blühende Weizenpflanzen (Kapitel 2.1.7) wurden mit einer Sporensuspension (ca. 10⁸ Sporen/ml, Kapitel 2.1.4) inokuliert (verändert nach Stack *et al.*, 2002). Mit einer Einwegspritze (Omnifix-F und Microlance 3, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde ein Tropfen der Sporensuspension in je eine Blüte einer Ähre injiziert. In einigen Fällen erfolgte die Inokulation über eine Pinzette mit Mycel des Pilzes. Die Ähre wurde nach der Inokulation 48 h mit einer von innen befeuchteten Plastiktüte umschlossen. Die Weizenpflanzen wurden nach der Infektion täglich 16 h

beleuchtet und regelmäßig gegossen. Zur Ernte der infizierten Ähren wurden diese unterhalb der untersten Blüte abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die geernteten Ähren wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.9 Inkubation von Weizenähren in sterilen Gläsern

Die Inokulation der Weizenpflanzen erfolgte wie beschrieben (Kapitel 2.1.8). Die Ähren wurden 48 h nach der Infektion abgeschnitten und in sterile Weckgläser (Stangen Form, J. Weck GmbH u. Co. KG, Wehr, Deutschland) mit A. bidest-Agar (1,5 % Agar-Agar, Roth) überführt (Abb. 2.1). Die Gläser wurden wie die Pflanzen inkubiert, mit der Ausnahme, dass das Gießen der Ähren nicht mehr nötig war (Kapitel 2.1.8). Zur Ernte der infizierten Ähren wurden diese aus den Gläsern gezogen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die geernteten Ähren wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.



Abb. 2.1: Inkubation von Weizenähren in Gläsern. Die Ähren wurden 48 h nach der Inokulation von der Pflanze in Weckgläser mit sterilem A. bidest-Agar überführt. Quelle: eigene Aufnahme.

2.2 Transformationen

2.2.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte über Elektrotransformation (BioRad Gene Pulser™ II, BioRad Pulse Controller Plus, BioRad Capacitance Extender Plus) nach einem veränderten Protokoll von Invitrogen [2003]. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 1,8 kV, 25 μ F, 200 Ω . 1 μ l Ligationsansatz (Kapitel 2.3.1) wurde mit 40 μ l elektrokompetenter *E. coli* Zellen (Kapitel 2.1.6) in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (electroporation cuvette 1 mm Gap, Molecular BioProducts, San Diego, USA) vermischt. Nach dem Stromstoß wurden die *E. coli* Zellen in 1 ml LB-Medium (Kapitel 2.1.5) aufgenommen und 1 h bei 37 °C, 600 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 1 min pelletiert (10000 g, Beckman Microfuge). Ca. 900 μ l des Überstandes wurden verworfen. Die Zellen wurden in den verbleibenden ca. 100 μ l des Überstandes resuspendiert. 15 μ l dieser Suspension wurden auf LB-Platten (Kapitel 2.1.5) ausgestrichen. Die Transformation von *E. coli* erfolgte grundsätzlich mit Plasmiden, die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermitteln. Die LB-Platten waren mit Ampicillin (100 μ g/ml, Roth) als Selektionsmarker versetzt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Überprüfung der Transformation wurde eine Kolonie-PCR (Kapitel 2.3.5) durchgeführt. Zur Gewinnung der in *E. coli* vermehrten Plasmide wurde eine Plasmidpräparation (Kapitel 2.3.5) durchgeführt.

2.2.2 Transformation von *F. graminearum*

Die Transformation von *F. graminearum* wurde nach einem modifizierten Protokoll von Royer *et al.* [1995] durchgeführt.

Material und Methoden

Für die Transformation wurde junges Mycel benötigt. Dazu wurden ca. $1 \cdot 10^6$ Sporen in 50 ml CM (Kapitel 2.1.1 und 2.1.4) gegeben und für 16 h bei 28 °C, 120 rpm inkubiert. Das gewachsene Mycel wurde über einen Metallfilter (0,25 mm Porengröße) vom Medium getrennt und mit 50 ml A. bidest und 50 ml 1 M MgSO₄ (Merck) gewaschen. Das gewaschene Mycel wurde in 10 ml Protoplastierlösung (s.u.) gegeben und ca. 3 h bei 34 °C und 80 rpm inkubiert. Die Protoplastenbildung wurde regelmäßig mit Hilfe eines Mikroskops untersucht. Waren unter dem Mikroskop abgerundete Zellen zu erkennen, die nach Zugabe von A. bidest platzten, wurde die Protoplastierung beendet.

Die Protoplasten wurden gefiltert (Metallfilter 0,05 mm Porengröße) und der Filter mit 20 ml 2 M Sorbitol (Roth) gewaschen. Das Filtrat mit den Protoplasten wurde im Ausschwingrotor bei 1300 g und 4 °C zentrifugiert (Beckman Allegra 6KM Centrifuge). Die pelletierten Protoplasten wurden nacheinander in 20 ml 1 M Sorbitol (Roth) und 20 ml STC (s.u.) resuspendiert und erneut wie beschrieben pelletiert. Die Protoplasten wurden nach dem letzten Zentrifugieren in vier Teile STC (s.u.) und einem Teil SPTC (s.u.) aufgenommen. Je 100 µl Protoplastensuspension wurden mit 5 µg Plasmid DNA (KO1-Vektor, Kapitel 2.2.3) oder Wasser in einem Eppendorf Reaktionsgefäß vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Weitere 20 min Inkubation erfolgten bei Raumtemperatur nach Zugabe von 1 ml SPTC (s.u.). Jeder Transformationsansatz wurde auf CM-Agarplatten mit 1 M Saccharose (Roth) und 100 µg/ml Hygromycin B (Duchefa) aufgebracht und auf der Plattenoberfläche vorsichtig ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 28 °C im Dunkeln. In regelmäßigen Abständen wurden die Platten auf Wachstum kontrolliert.

Gewachsene Kolonien wurden in flüssiges Sporulationsmedium (Kapitel 2.1.4) mit 100 µg/ml Hygromycin B (Duchefa) zur Sporenbildung umgesetzt. Zur Sporenisolation wurde wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben verfahren, die Inkubation wurde allerdings nach acht Tagen beendet. Die isolierten Sporen wurden 1:1000 verdünnt. Je 1 µl der verdünnten Sporensuspensionen wurde auf CM-Platten mit 100 µg/ml Hygromycin B (Duchefa) ausplattiert. Aus den Sporen gewachsene Einzelkolonien (Einzelsporenkolonien) wurden in flüssiges CM (100 µg/ml Hygromycin B, Duchefa) umgesetzt und wie beschrieben inkubiert (Kapitel 2.1.1).

Material und Methoden

Der Nachweis der Transformation wurde über PCRs (Kapitel 2.3.2) erbracht (Kapitel 3.2.5).

Zusammensetzung Protoplastierlösung: 10 mg/ml Driselase (Sigma) in 1 M MgSO₄ (Merck).

Zusammensetzung STC: 0,8 M Sorbitol (Roth), 50 mM Tris (Merck) pH 8, 50 mM CaCl₂ (Merck).

Zusammensetzung SPTC: 0,8 M Sorbitol (Roth), 40 % PEG 4000 (Roth), 50 mM Tris (Merck) pH 8, 50 mM CaCl₂ (MERCK).

2.2.3 KO1-Vektor zur Transformation von *F. graminearum*

Zur Konstruktion des KO1-Vektors wurde der auf pUC19 basierende Vektor pCB1003 verwendet, der der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Pöggeler von der Ruhruniversität Bochum zur Verfügung gestellt wurde [Carroll *et al.*, 1994]. Dieser Vektor enthält das Gen der Hygromycinphosphotransferase, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin B verleiht.

Der Vektor pCB1003 wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*H1 geschnitten (5 µg pCB1003, 40 U *Bam*HI (NEB), 5 µl *Bam*HI-Puffer (NEB), mit A. bidest auf 50 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt). Der Verdau wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde anschließend bei 75 °C für 15 min denaturiert. Der Verdau wurde über den QIAquick-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) aufgereinigt und in 10 µl Puffer (QIAquick) aufgenommen. Im Anschluss erfolgte ein zweiter Verdau mit dem Restriktionsenzym *Hind*III (10 µl Aufreinigung, 40 U *Hind*III (NEB), 5 µl Puffer 2 (NEB), mit A. bidest auf 50 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt). Der Verdau wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym wurde anschließend bei 75 °C für 15 min denaturiert. Der geschnittene Vektor wurde mit Hilfe eines 1 %igen Agarosegels (Kapitel 2.3.6) aufgereinigt. Die Vektorbande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über den NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel)

Material und Methoden

aus der Agarose extrahiert, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde (Kapitel 2.3.7).

Für eine Integration des Vektors über homologe Rekombination benötigt man in dem Vektor ein zu einem *F. graminearum* Gen homologes Sequenzstück. Dazu wurde eine PCR (Kapitel 2.3.2) mit genomischer DNA von *F. graminearum* als Template (Primer ace1bamh1uni und ace1pst1rev, Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1) durchgeführt. Das Amplikon von ca. 2400 bp wurde über ein 1 %iges Agarosegel aufgereinigt, ausgeschnitten und über den NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel) aus der Agarose extrahiert, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde (Kapitel 2.3.6 und 2.3.7). Anschließend erfolgte ein Verdau des Amplikons mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (Schnittstelle des Primers ace1bamh1uni) und *Hind*III (interne Schnittstelle) wie oben beschrieben (Fragmentgröße 592 bp). Der Verdau wurde über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt, die Bande bei ca. 600 bp ausgeschnitten und über den NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel) aus der Agarose extrahiert, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde (Kapitel 2.3.6 und 2.3.7). Das Fragment des *ace1*-Gens bildet die „left border“ (LB, Abb. 2.2) des Vektors KO1 (Abb. 2.3).

```
GATCCATGTCCTTCTCCACCCTCGTCTGAAGGACTCCGGTGACTCGTCCGGACTGCGACACCGAG
AATGCCTTGTCTTTAAGAACAGCTCTACCTCCGTAAGGGTGCACCTTCCACTCTCCTACATC
ACCATCTTTGACTTCGGACATGCTTTGTCCCTCCTACTTTGCCTCGAGCCCAGTCCCATCTGG
ATGATGTCGTCGATGCCAACCGTCGACGTTGTGGCCTTGACTCTCAACGACATCGACGAGGCTCTT
GCCAAGACCCAAGAGCTCTCTCTGTTCATCCACGTCAAAGCCCATGACTCTTCGCGACACCGGTCT
TCCTATCCCTCGCGGCTTCTCTCGAGGGACCTATCGTTCGATCCCAAGATGACAAAAGAAGAAGAGA
GGCGCACCTGCGCCCCAGAGGCCGCACTTCGCGGGCTCTTGAGGACCATTCCGATAGCGGTTTG
GGTACATCAGTAGCTTCCACAAAACGAGAAGCGGGGCGCGGTCACTGCATCAAAGGAGGCAAAGGT
GCAAACACGATGCCTCACAAAGATCCGCCCGCCCGCCGCGCAGCAACGGGAAGCTCCCTTCACTGG
GATCAAA
```

Abb. 2.2: Nukleotidsequenz (592 bp) der „left border“ (LB) des Vektors KO1. Die LB wurde aus dem *ace1*-Gen aus *F. graminearum* abgeleitet.

Der *Bam*HI / *Hind*III geschnittene pCB1003 Vektor wurde mit der „left border“ ligiert (1 µl pCB1003 *Bam*HI / *Hind*III verdaut, 3 µl „left border“ *Bam*HI / *Hind*III verdaut, 400 U T4 Ligase (NEB), 1 µl 10 X T4-Ligase Puffer (NEB) und 4 µl A. bidest). Die Ligation wurde für 18 h bei 4 °C inkubiert. *E. coli* Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Plasmide

Material und Methoden

wurden wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben aus den *E. coli* Zellen präpariert. Der resultierende Vektor (4662 bp) wurde KO1 genannt (Abb. 2.3). Die Überprüfung der korrekten Ligation des Vektors erfolgte über PCRs (Kapitel 3.2.5.1).

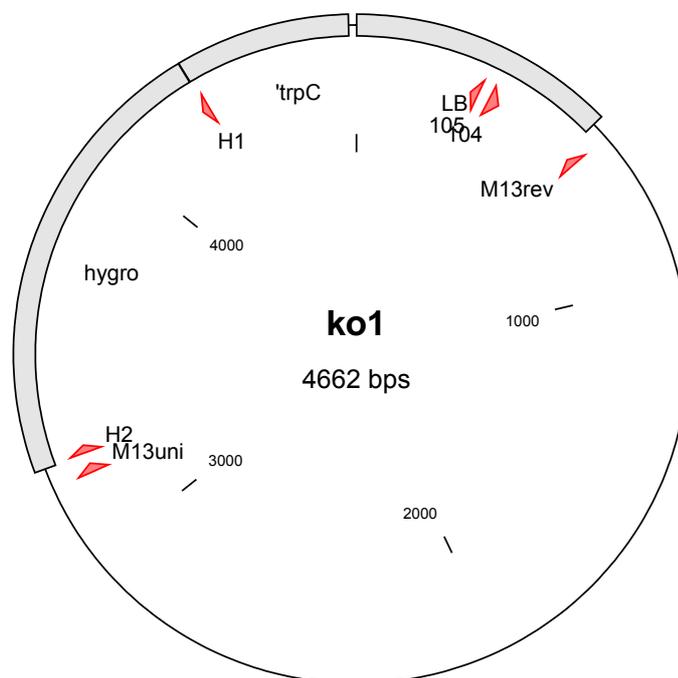


Abb. 2.3: KO1-Vektor zur Transformation von *F. graminearum*. LB = „left border“ (Abb. 2.2), ace1uni4 (104), ace1rev4 (105), hygrouni (H1), hygrorev (H2), M13uni und M13rev = Primerbindestellen (Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1), hygro = Hygromycinphosphotransferasegen, `trpC = trpC-Promotor.

2.3 *Ligation und PCR*

2.3.1 Ligation in pGem-T

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der pGem-T Kit von Promega verwendet (pGem[®]-T vector system, Promega). Der pGem-T-Vektor vermittelt eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin. Es wurden 1 µl PCR-Fragment (Kapitel 2.3.2), 1 µl Vektor pGem-T (50 ng), 1 µl T4-DNA-Ligase (3 U) und 5 µl 2 X Reaktionspuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Vermehrung der Plasmide erfolgte in *E. coli* Zellen (Kapitel 2.2.1).

2.3.2 PCR

Alle verwendeten Primer wurden von MWG bezogen. Für die PCRs wurde entweder ein Kit der Firma ABgene (ABgene Thermostable DNA Polymerase 5 U/µl) oder ein Kit der Firma Qiagen (*Taq*-Polymerase, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) verwendet.

Ansatz ABgene: 1 µl Template (~100 ng), 1 µl (10 pmol) Primer forward, 1 µl (10 pmol) Primer reverse, 5 µl 10 X reaction buffer (ABgene), 2 µl dNTP-Mix (10 mM pro dNTP, Eppendorf), 3 µl MgCl₂ (1,5 mM, ABgene), 0,25 µl DNA Polymerase (1,25 U, ABgene) und 36,75 µl A. bidest.

Ansatz Qiagen: 1 µl Template (~100 ng), 1 µl (10 pmol) Primer forward, 1 µl (10 pmol) Primer reverse, 2,5 µl 10 X reaction buffer (Qiagen), 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM pro dNTP, Eppendorf), 0,25 µl *Taq* DNA polymerase (1,25 U, Qiagen), 1,5 µl Q-solution (Qiagen) und 15,25 µl A. bidest.

Material und Methoden

PCRs wurden, soweit nicht anders angegeben, mit den im Anhang in Tab. A.2 angegeben Annealing-Temperaturen durchgeführt (Primus Cycler, MWG). Ein Schema des Ablaufs der PCRs zeigt Abb. 2.4. Bei PCRs mit genomischer DNA als Template wurden stets 25 Zyklen wiederholt mit einer Elongationsphase von 1-2 min.

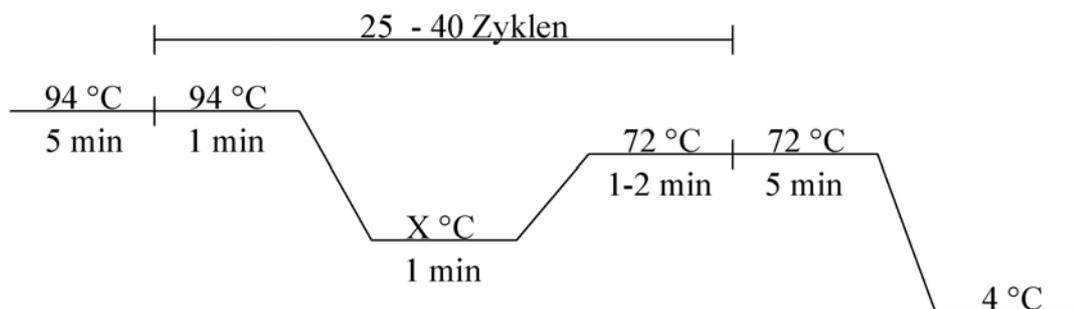


Abb. 2.4: Schema der verwendeten PCR Programme. Die Annealing Temperaturen (in der Abb. mit „X“ gekennzeichnet) sind dem Anhang Tab. A.2 zu entnehmen.

2.3.3 Inverse PCR

Mit der inversen PCR können unbekannte Sequenzbereiche am 5' und 3' Ende einer bekannten Sequenz amplifiziert und sequenziert werden [Triglia *et al.*, 1988; Ochman *et al.*, 1993; Triglia, 2000]. Dazu wurden je ca. 10 µg DNA aus *F. graminearum* mit verschiedenen Restriktionsenzymen (s.u.) 2 h bei 37 °C verdaut. In einer anschließenden Ligation wurden die kompatiblen Enden des selben DNA-Fragments miteinander ligiert. Um die Wahrscheinlichkeit einer Ligation der beiden Enden eines Fragments gegenüber einer Ligation zweier freier DNA-Fragmente zu erhöhen, wurde das Reaktionsvolumen auf 500 µl erhöht (4000 U T4 Ligase (NEB), 50 µl 10 X T4-Ligase Puffer (NEB), 50 µl DNA-Verdau (s.u.), Reaktionsvolumen auf 500 µl mit A. bidest aufgefüllt). Die Ligation wurde für 18 h bei 4 °C inkubiert.

Verwendete Restriktionsenzyme und eingesetzte Units in Klammern (soweit nicht anders angegeben, stammen alle Enzyme von der Firma NEB): *AscI* (50 U), *BamHI*

Material und Methoden

(100 U), *Bgl*III (Roche, 50 U), *Bsp*HI (50 U), *Cla*I (25 U), *Eco*RI (100 U), *Eco*RV (100 U), *Hha*I (Promega, 50 U), *Hind*III (100 U), *Hsp*92II (Promega, 50 U), *Mse*I (50 U), *Msp*I (Promega, 50 U), *Nco*I (50 U), *Nde*I (100 U), *Not*I (50 U), *Pst*I (100 U), *Pvu*I (25 U), *Rca*I (Roche, 25 U), *Sac*I (100 U), *Sau*3AI (20 U), *Sma*I (100 U), *Taq*I (Promega, 50 U), *Tru*9I (Promega, 50 U), *Xba*I (100 U), *Xho*I (100 U).

Es wurden jeweils die vom Hersteller angegebenen Puffer verwendet. Angaben für einen Ansatz: 10 µg DNA, 5 µl Restriktionsenzym, 5 µl 10 X Reaktionspuffer, mit A. bidest auf 50 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Die Denaturierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 75 °C für 15 min.

Einige inverse PCR Schritte wurden mit zwei Gemischen verschiedener Ligationen durchgeführt (Zusammensetzung s.u.). Dazu wurden 150 µl der Ligationen vereinigt und mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt (2 h, 4 °C, 20000 g, Beckman Microfuge R). Die Pellets wurden mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen (15 min, 4 °C, 20000 g) und ca. 15 min bei 45 °C getrocknet (Eppendorf, Concentrator 5301). Die gewaschenen Pellets wurden in 100 µl A. bidest resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Die vereinigten und ankonzentrierten Ligationen wurden MIP-1 und MIP-2 (Meta-Inverse PCR, s.u.) genannt.

MIP-1: *Asc*I, *Bam*HI, *Bgl*III, *Bsp*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Mse*I, *Nco*I, *Nde*I, *Not*I, *Pst*I, *Rca*I, *Sac*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I.

MIP-2: *Hha*I, *Hsp*92II, *Msp*I, *Pvu*I, *Sau*3AI, *Taq*I, *Tru*9I.

PCRs wurden wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden stets 40 Zyklen wiederholt mit einer Elongationsphase von 2 min.

2.3.4 RT-PCR und cDNA Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde ein Kit von Promega (MMLV-RT RNase H Minus, Point Mutant) verwendet. Ca. 1 µg RNA wurde mit 1 µl oligo dT-Primer (100 pmol,

MWG, s. Anhang Tab. A.1) versetzt und 5 min bei 94 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 15 min auf Eis gekühlt. Es wurden 3 µl 10 X Reaktionspuffer (Promega), 25 U MMLV-RT (Promega) und 2 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP, Eppendorf) zugegeben. Das Volumen wurde mit RNase freiem Wasser (ICN, Costa Mesa, USA) auf 30 µl eingestellt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die MMLV-RT wurde im Anschluss 10 min bei 75 °C denaturiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Die PCRs wurden wie beschrieben durchgeführt (Kapitel 2.3.2). Es wurden stets 40 Zyklen wiederholt mit einer Elongationsphase von 1-2 min.

2.3.5 Kolonie-PCR und Plasmidisolaton

Zur Überprüfung der Elektroporation von *E. coli* Zellen (Kapitel 2.2.1) wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Die PCRs wurden mit plasmidspezifischen Primern (M13uni und M13rev, s. Anhang Tab. A.1) wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Bei der Kolonie-PCR wurden stets 25 Zyklen wiederholt mit einer Elongationsphase von einer Minute. Als Template wurde jeweils eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte eingesetzt (Kapitel 2.2.1), die im ersten 94 °C-Schritt der PCR lysiert wird (als Ausgleich wurde 1 µl A. bidest statt Template zugegeben). Mit der selben Kolonie wurden 3 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin, Roth, Kapitel 2.1.5) in einem Reagenzglas angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Dunkeln im Rotationsschüttler inkubiert.

Die Kolonie-PCRs wurden über 1 %ige Agarosegele aufgetrennt (Kapitel 2.3.6). Anhand der Größe der Amplikons (Größe des ligierten Fragments (Kapitel 2.3.1) zuzüglich 249 bp amplifizierter Vektorsequenz) wurden geeignete Ansätze zur Plasmidisolaton ausgewählt.

Aus den angewachsenen *E. colis* wurden mit Hilfe des Nucleospin[®] -Plasmid-Mini-Kits (Macherey-Nagel) nach den Instruktionen des Herstellers die Plasmide isoliert. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20 °C.

Material und Methoden

2.3.6 Agarosegele

Nukleinsäuren wurden auf 1 %igen Agarose Mini-Gelen aufgetrennt [nach Sambrook *et al.*, 1989]. Die Agarose (Agarose NEE0, Roth) wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris (Merck), 20 mM Eisessig (Merck), 1 mM EDTA (Roth), pH 8,5) aufgeköcht, mit Ethidiumbromidlösung (26 ng/ml, Roth) versetzt und in dafür vorgesehene Gelschiffchen (BioRad, Mini Sub Cell GT) gegossen. Nach dem Erkalten der Gele wurden diese mit den mit Ladepuffer (1 µl Ladepuffer (s.u.) pro 5 µl Probe) versetzten Nukleinsäuren beladen und bei 120 V etwa 20 min aufgetrennt (BioRad PowerPac 300). Die Agarosegele wurden mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt und abgelichtet (BioRad Gel Doc 2000). Bei allen Agarosegelläufen wurde als Größenmarker die 1-kb-Leiter verwendet (Invitrogen, Abb. 2.5).

Zusammensetzung Ladepuffer (10 ml): 5 ml Glycerin (Roth), 20 mg Bromphenolblau (Roth), 1,5 ml 0,5 M EDTA (Roth) und 3,5 ml A. bidest.

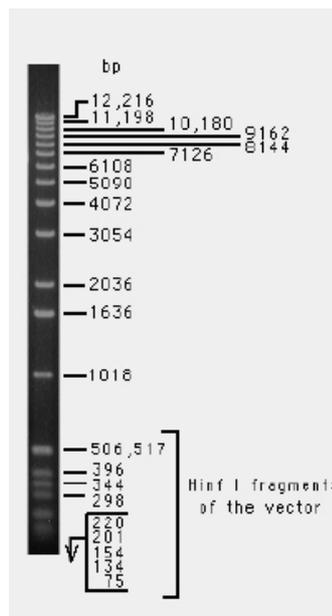


Abb. 2.5: Bei Agarosegelen verwendete 1-kb-Leiter von Invitrogen. Die Größe der Banden in bp ist angegeben. Quelle: Invitrogen 1 kb DNA Ladder Manual.

2.3.7 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Um Nukleinsäuren aus Agarosegelen (Kapitel 2.3.6) zu extrahieren, wurde ein Kit der Firma Macherey und Nagel verwendet (NucleoSpin[®] Extract, Macherey-Nagel). Es wurde dabei nach dem vom Hersteller vorgeschriebenen Protokoll verfahren (Protocol for DNA extraction from agarose gels using the NucleoSpin[®] Extract kit). Auf diese Weise extrahierte Nukleinsäuren wurden bei -20 °C gelagert.

2.4 DNA und RNA Isolation

2.4.1 Nukleinsäureisolation

Die Isolation der Nukleinsäuren erfolgte nach der Harnstoffmethode [Conze, 2003]. Es wurden ca. 0,1 g Mycel (Frischgewicht) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit 300 µl 10 M Harnstoff (Roth) und 300 µl Isolationspuffer (0,6 M NaCl (Roth), 0,1 M Tris (Merck), 40 mM EDTA (Roth), 4 % Sacrosyl (N-Lauroylsacrosine-sodium salt, Serva, Heidelberg) und 1 % SDS (Roth)) versetzt. Anschließend wurden 300 µl Phenol (DNA / RNA Isolation, Roth) und 600 µl Phenol / Chloroform (1:1, v/v, Roth) zugegeben. Das Gemisch wurde 10 s lang gevortext und anschließend zentrifugiert (15 min, 4 °C, 20000 g, Beckman Microfuge R). Die obere Phase wurde entnommen, mit 0,7 Volumen Isopropanol (-20 °C, Merck) vermischt und 2 h bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Die pelletierten Nukleinsäuren wurden mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen (15 min, 4 °C, 20000 g), für 15 min bei 45 °C getrocknet (Eppendorf, Concentrator 5301) und in 50 µl A. bidest aufgenommen.

2.4.2 RNA Isolation

Zur Präparation von RNA wurden die isolierten Nukleinsäuren (Kapitel 2.4.1) mit DNase behandelt. Ca. 10 µg Nukleinsäuren wurden mit 10 µl 1 M KCl (Merck), 10 µl 30 mM MgSO₄ (Merck), 10 µl 10 mM Tris (Merck) pH 8,3 und 50 U DNase (DNaseI, RNase frei, Roche) versetzt und mit A. bidest auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde wie oben beschrieben erneut mit Phenol / Chloroform gereinigt und mit Isopropanol gefällt (Kapitel 2.4.1). Die Lagerung von RNA erfolgte bei -20 °C.

2.4.3 DNA Isolation

Zur Präparation von DNA wurden die isolierten Nukleinsäuren (Kapitel 2.4.1) mit RNase behandelt. 1 µl RNase (RNase DNase frei, Roche) wurde zu 50 µl der isolierten Nukleinsäuren gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde wie oben beschrieben erneut mit Phenol / Chloroform gereinigt und mit Isopropanol gefällt (Kapitel 2.4.1). Die Lagerung von DNA erfolgte bei 4 °C.

2.5 Auswertung und Bearbeitung von Sequenzdaten

Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Dr. Muth mit Hilfe des ABI PRISM® 3700 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Sequenzen wurden als Textfile ausgegeben und über den NCBI Blast Server analysiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Dabei wurden die Programme blastn (Suche gegen Nukleotidsequenzen aus Datenbanken) und blastx (in Proteinsequenzen übersetzte Nukleotidsequenz gegen Proteinsequenzen aus den Datenbanken) eingesetzt.

Material und Methoden

Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Programms Sixframe der Internetseite <http://workbench.sdsc.edu/> aus kodierenden Sequenzen übersetzt und mit dem Programm blastp (Proteinsequenz gegen Proteinsequenzen aus den Datenbanken) des NCBI-Servers analysiert [NCBI National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894].

Multiple Sequenzalignments wurden über das Internetprogramm ClustalW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>, The European Bioinformatics Institute (EBI)).

Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des SignalP-Programms auf das Vorhandensein von Signalpeptiden untersucht (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) [Nielsen *et al.*, 1997].

Die Berechnung von 3-dimensionalen (3D)-Modellen von Proteindomänen wurde mit dem SwissProt Server durchgeführt (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). Die Darstellung der berechneten Modelle erfolgte mit den Programmen RasMol 2.7 (RasWin Molecular Graphics, Glaxo Wellcome, Stevenage, UK) oder Deepview (GlaxoSmithKline, Uxbridge, UK & Swiss Institute of Bioinformatics, Basel, Schweiz).

Die Berechnung des Proteinstammbaumes erfolgte mit dem Programm Phylip (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/drawgram-simple.html>).

Phosphorylierungsstellen wurden mit dem Programm NetPhos 2.0 auf der Seite <http://www.cbs.dtu.dk/> bestimmt.

Konservierte Sequenzbereiche von Proteinen (Signaturen) wurden der Seite Prosite (<http://au.expasy.org/prosite/>) entnommen [Hulo *et al.*, 2004].

„Glycoside Hydrolases“ (GH) und „Carbohydrate binding modules“ (CBMs) wurden der Datenbank CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>) entnommen [Coutinho und Henrissat, 1999].

Das Genom von *F. graminearum* PH-1 (NRRL 31084) ist beim Whitehead Institute / MIT Center for Genome research 2003 veröffentlicht worden. Bei der Suche nach Genen und Proteinen im Genom von *F. graminearum* PH-1 wurden die auf der

Material und Methoden

Internetseite des Whitehead Institutes angebotenen Suchprogramme verwendet (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>).

3 Ergebnisse

Pflanzliche Zellen sind von einer Zellwand umgeben, die den Zellen nicht nur Stabilität vermittelt, sondern auch eine schwer zu überwindende Barriere für einen pathogenen Angriff darstellt. Für *F. graminearum* hat der Abbau pflanzlicher Zellwände zwei Bedeutungen. Zum einen ist ein Überwinden der pflanzlichen Zellwand notwendig, um an die Inhaltsstoffe der Zellen zu gelangen, zum anderen spielen die Abbauprodukte der Zellwand vermutlich eine Rolle bei der Ernährung des Pilzes während der Etablierung in der Pflanze. Zum Abbau der Zucker pflanzlicher Zellwände bilden Phytopathogene eine ganze Batterie von Enzymen, von denen erst sehr wenige in *F. graminearum* molekularbiologisch untersucht worden sind (pektinabbauende Enzyme [Conze, 2003] und Proteasen [Hellweg, 2003]).

Cellulose ist ein Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände. Der enzymatische Abbau von Cellulose wird von zwei Typen von Cellulasen bewerkstelligt. Endocellulasen spalten Celluloseketten innerhalb der Kette und setzen Oligomere frei. Sie produzieren neue Kettenenden, an denen die Exocellulasen (Cellobiohydrolasen) vor allem Cellobiose freisetzen. Die aus der Cellobiose über β -Glucosidasen freigesetzte Glucose ist das Endprodukt des Celluloseabbaus. Zwar war bekannt, dass *F. graminearum* Cellulose als Substrat verwerten kann [Wanjiru *et al.*, 2002], doch sind bisher keine Cellulasen des Pilzes molekularbiologisch untersucht worden. Der erste Abschnitt des Ergebnisteils (Kapitel 3.1) beschäftigt sich daher mit dem Cellulasesystem von *F. graminearum* K59.

So gut wie alle bisher bekannten Gene zellwandabbauender Enzyme unterliegen einer Regulation auf Transkriptionsebene. Bisher gibt es erst wenige bekannte Transkriptionsfaktoren aus filamentösen Pilzen, die an der Regulation von Genen zum Abbau pflanzlicher Zellwände beteiligt sind (Kapitel 1.4.2).

Einer der bekannten Regulatoren ist der Transkriptionsfaktor ACEI aus *T. reesei*. Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils (Kapitel 3.2) soll untersucht werden, ob

Cellulasegene in *F. graminearum* über den Transkriptionsfaktor ACEI reguliert werden und ob dieser Faktor für die Virulenz bzw. Pathogenität des Pilzes von Bedeutung ist.

Im dritten Abschnitt des Ergebnisteils (Kapitel 3.3) werden die Introns der sequenzierten Gene aus *F. graminearum* auf konservierte Nukleotidsequenzen untersucht und mit bereits bekannten Konsensussequenzen für Introns aus Fusarien verglichen.

Im vierten und letzten Abschnitt des Ergebnisteils (Kapitel 3.4) soll das genetische Potential von *F. graminearum* in Bezug auf den Abbau pflanzlicher Zellwände untersucht werden. Dazu wurde das Mitte 2003 veröffentlichte Genom von *F. graminearum* PH-1 [Whitehead Institute / MIT Center for Genome research] auf Gene hin untersucht, die am Zellwandabbau beteiligte Proteine kodieren.

3.1 Cellulasen aus *F. graminearum* K59

Im Genom von *F. graminearum* konnten mit Hilfe heterologer Primer Gene von Cellulasen der GH-Familien 6 (Kapitel 3.1.1), 7 und 45 (Kapitel 3.1.2) identifiziert werden.

3.1.1 Das Gen der Cellulase der GH-Familie 6

Cellulasen der GH-Familie 6 kommen in zahlreichen Pilzen vor, von denen einige wie *Fusarium oxysporum* und *T. reesei* in naher Verwandtschaft zu *F. graminearum* stehen. Es war daher wahrscheinlich, dass auch *F. graminearum* Cellulasen der GH-Familie 6 besitzt. Mit Hilfe von PCR-Methoden konnte das Gen einer Cellulase der GH-Familie 6 (*cel6*) im Genom gefunden und sequenziert werden (Kapitel 3.1.1.1).

Neben der Transkription des *cel6*-Gens (Kapitel 3.1.1.2) wurde auch die aus der kodierenden Sequenz abgeleitete Proteinsequenz (Kapitel 3.1.1.3) untersucht.

3.1.1.1 Sequenz des *cel6*-Gens

Um ein potentielles Gen einer Cellulase der GH-Familie 6 im Genom von *F. graminearum* zu finden, wurden die Nukleotidsequenzen zweier Cellulasen der GH-Familie 6 von *F. oxysporum* („B-family“ Cellulase, GenBank L29377) und *T. reesei* (Cellobiohydrolase II, GenBank M16190) über das Internetprogramm ClustalW verglichen (nicht gezeigt). Aus zwei Bereichen größerer Homologie wurden die heterologen Primer *cel6uni1* und *cel6rev1* abgeleitet (s. Anhang Tab. A.1). Eine PCR mit den Primern *cel6uni1* und *cel6rev1* sowie genomischer DNA von *F. graminearum* amplifizierte ein Fragment von ca. 1200 bp (Abb. 3.1).

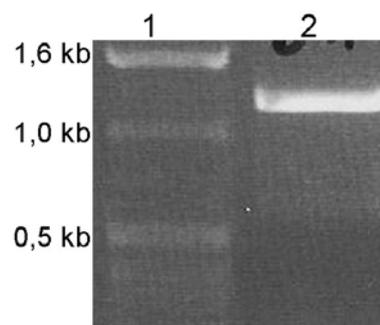


Abb. 3.1: PCR mit genomischer DNA von *F. graminearum* als Template (degenerierte Primer *cel6uni1* und *cel6rev1*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons bei ca. 1200 bp (Fragmentgröße 1214 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Sequenz des Fragments (1214 bp) zeigte hohe Homologien zu den Nukleotidsequenzen des „B-family“ Cellulasegens aus *F. oxysporum* (GenBank L29377) und des *cbh2*-Gens aus *T. reesei* (GenBank M16190).

Ergebnisse

Die vollständige Sequenzierung des *cel6*-Gens aus *F. graminearum* erfolgte über zwei inverse PCR Schritte (Primer *cel6inv1* und *cel6inv2*, nicht gezeigt und Primer *cel6inv3* und *cel6inv4*, Abb. 3.2., Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Die vollständige genomische Sequenz des *cel6*-Gens ist 1581 bp lang (Abb. 3.3).

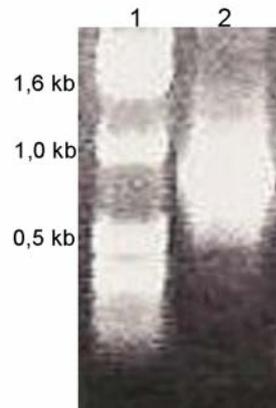


Abb. 3.2: Inverse PCR mit zirkularisierter DNA von *F. graminearum* als Template (*Bgl*II-Verdau, Kapitel 2.3.3, Primer *cel6inv3* und *cel6inv4*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons bei ca. 900 bp. Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Durch die Sequenzierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA des *cel6*-Gens konnten vier Introns mit einer Länge von 52, 49, 50 und 56 bp identifiziert werden. Die kodierende Sequenz des *cel6*-Gens ist damit 1374 bp lang (Abb. 3.3). Sie weist eine Identität von 84 % zur kodierenden Sequenz des „B-family“ Cellulasegens aus *F. oxysporum* (GenBank L29377) und eine Identität von 63 % zur kodierenden Sequenz des *cbh2*-Gens aus *T. reesei* (GenBank M16190) auf. Das *cel6*-Gen kodiert damit mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine Cellulase der GH-Familie 6 (Kapitel 3.1.1.3).

```
ATGACGGCCTACAAGCTTTTCTGGCTGCTGCTTTTGCAGCCACTGCTCTCGCAGCT
CCTGTTGAAGAGCGTCAGTCTTGCAGCAACGGAGTCTGGTGAGTGTTCAGCCATC
TTTTTAAAGAATTAATTACTCACATACCCATAGGTCTCAATGTGGTGGTCAGAACTG
GAGCGGTACTCCTTGCTGCACCAGTGGAACAAGTGTGTCAAGGTCAACGACTTCTA
CTCCCAATGCCAGCCTGGATCCGCAGACCCTTCTCCACGAGCACCATTGTCAGTGC
CACAACCACCAAGGCTACTACCCTGGTAGTGGAGGCTCTGTACCTCGCCTCCTCC
TGTTGCCACCAACAATCCCTTCTCTGGCGTTGATCTGTGGGCCAACAACTACTACCG
CTCCGAGGTCAGCACTCTCGCTATCCCCAAGCTGAGCGGTGCCATGGCCACCGCTGC
TGCCAAGGTCGCCGATGTTCCCTTCTTCCAGTGGATGTGAGTTACGAGTCCCTTTGG
ATATATACCTCTTTACTAACCACGATAGGGACACTTATGACCACATCTCCTTCATGG
AGGACTCTCTTGCCGATATCCGCAAGGCCAACAAAGGCTGGTGGCAACTACGCTGGTC
AGTTCGTCGTCTACGATCTTCCCGACCGTGACTGTGCTGCTGCTGCCTCCAACGGAG
AGTACTCCCTTGACAAGGATGGCAAGAACAAGTACAAGGCCCTACATTGCAGATCAAG
GGATCCTTCAGGACTACTCTGACACCCGCATCATTCTCGTTATCGTTAGTCCACCT
GATTGACTCCGACTTAGTTCTACTAACAGCCATTTAGAGCCTGATTCTCTTGCTAA
CATGGTCACCAACATGAACGTCCCCAAGTGCGCCAACGCTGCTAGCGCTTACAAGGA
GCTCACCATTACGCCCTCAAGGAGCTCAACCTTCCCAACGTCTCCATGTACATCGA
TGCAGGTCACGGTGGCTGGCTGGGATGGCCCGCCAACCTTCCCTCCTGCCGCCAGCT
CTACGGTCAGCTCTACAAGGATGCCGGCAAGCCATCTCGCCTCCGAGGTCTCGTCAC
CAACGTCTCCAACACTACAACGCCTGGAAGCTGTCCTCCAAGCCCGACTACACTGAGAG
CAACCCCAACTACGACGAGCAGAAGTACATCCACGCTCTATCTCCTCTTCTGGAGCA
GGAGGGCTGGCCCGGTGCCAAGTTCATCGTCGACCAGGGCCGATCTGGTAAGCAGCC
CACTGGCCAGAAGGCTTGGGGTACTGGTGAACGCTCCCGGAACTGGATTCCGGTCT
CCGACCCTCTGCCAACACTGGCGATGCCCTCGTCGACGCTTTCGTCTGGGTCAAGCC
TGTTGGTGAGTCTGATGGTACCTCTGATACTCTGCTGCTCGCTACGACTACCACTG
CGGTATTGACGGCGCTGTCAAGTAAGTTTTATAATACAAATCCTCAAGTTAACCCCTC
ATACTAACCCCGATAACTAGGCCCGCTCCTGAGGCTGGAACCTGGTTCCAGGCTTAC
TTTGAGCAGCTTCTCAAGAACGCCAACCCCTCTTTCCTGTAA
```

Abb. 3.3: Nukleotidsequenz (1581 bp) des *cel6*-Gens aus *F. graminearum*. Introns sind grau hinterlegt, Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Intronpositionen: Intron 1: 96-147, Intron 2: 493-541, Intron 3: 787-836, Intron 4: 1447-1502. Die Nukleotidsequenz ist in der GenBank Datenbank unter der Nummer AY302753 hinterlegt.

Die vier Introns des *cel6*-Gens wurden mit Konsensussequenzen für Introns in filamentösen Pilzen [Gurr *et al.*, 1987] und Fusarien [Brown *et al.*, 2001] verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Intron Grenzen als auch die internen Verzweigungsstellen den Konsensussequenzen entsprechen (Kapitel 3.3). Alle Introns liegen in dem Bereich der typischen Intronlänge von ca. 60 bp mit einer Spanne zwischen 49 und 90 bp in Fusarien [Brown *et al.*, 2001].

3.1.1.2 Transkription des *cel6*-Gens

Die Transkription von Cellulasegenen wird durch Transkriptionsfaktoren induziert [Suto und Tomita, 2001]. Fehlt diese Induktion, sind die Gene im Genom in der Regel abgeschaltet. Um zu untersuchen, ob sich dieses allgemeine Muster der Transkriptionsregulation auch für das *cel6*-Gen bestätigen lässt, wurde die Transkription des Gens beim Wachstum von *F. graminearum* mit verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht.

Das *cel6*-Gen wurde nach 48 und 96 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle nicht transkribiert (Abb. 3.4). Die Abbildung 3.4 zeigt die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 1600 bp (Fragmentgröße 1581 bp) in den Spuren 2, während in den Spuren 3 (cDNAs) keine Banden zu erkennen sind.



Abb. 3.4: PCRs mit genomischer DNA oder cDNAs von *F. graminearum* als Template (Primer *cel6uni2* und *cel6rev2*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 1600 bp (Fragmentgröße 1581 bp). Die Spuren 3 (PCRs mit cDNAs als Template) zeigen keine Banden. Die in den Spuren 3 eingesetzten cDNAs wurden aus Mycel nach 48 h (links) und 96 h (rechts) Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Wuchs *F. graminearum* in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle, so konnten sowohl nach 48 als auch nach 96 h Wachstum Transkripte des *cel6*-Gens nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Die Banden der

Ergebnisse

amplifizierten Fragmente der cDNAs in den Spuren 3 sind aufgrund der fehlenden Introns immer etwas kleiner als die Banden der amplifizierten Fragmente der genomischen DNA in den Spuren 2.

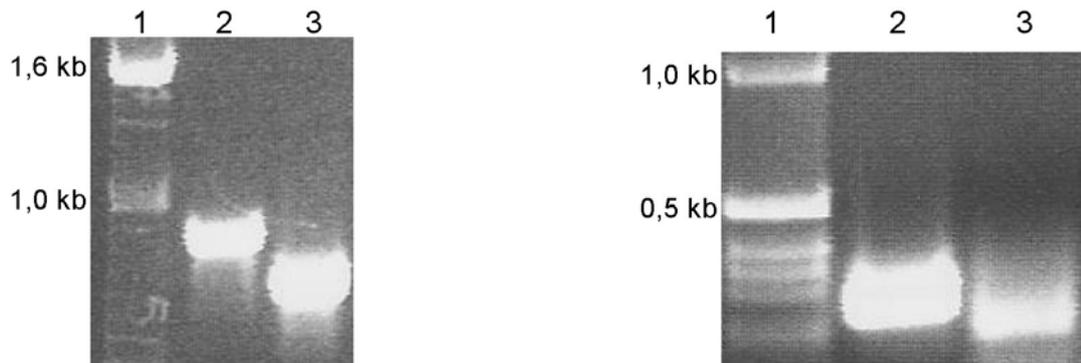


Abb. 3.5: PCRs mit genomischer DNA oder cDNAs von *F. graminearum* als Template (links: Primer cel6uni2 und cel6rev3, rechts: Primer cel6inv2 und cel6rev2, s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 900 bp (links, Fragmentgröße 872 bp) und ca. 250 bp (rechts, Fragmentgröße 255 bp). Die Spuren 3 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit cDNAs als Template bei ca. 700 bp (links, Fragmentgröße 721 bp) und ca. 200 bp (rechts, Fragmentgröße 199 bp). Die in den Spuren 3 eingesetzten cDNAs wurden aus Mycel nach 48 h (links) und 96 h (rechts) Wachstum in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Transkription des *cel6*-Gens wurde nach unterschiedlich langem Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transkription des *cel6*-Gens erst nach 32 bis 48 h startet und mindestens 96 h anhält. Zu früheren Zeitpunkten konnte eine Transkription nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Transkription des *cel6*-Gens nach unterschiedlich langem Wachstum von *F. graminearum* in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle (über RT-PCRs nachgewiesen).

6 h	8 h	12 h	24 h	32 h	48 h	72 h	96 h
—	—	—	—	—	+	+	+

Ergebnisse

Cellulose Typ 20 ist als reine Cellulose kein naturnahes System. Daher wurde untersucht, ob das *cel6*-Gen auch bei Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Weizenzellwand transkribiert wird. Eine Transkription des *cel6*-Gens konnte bei Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand nur nach 96 h nachgewiesen werden, während nach 48 h keine Transkripte des Gens gefunden werden konnten (Abb. 3.6).

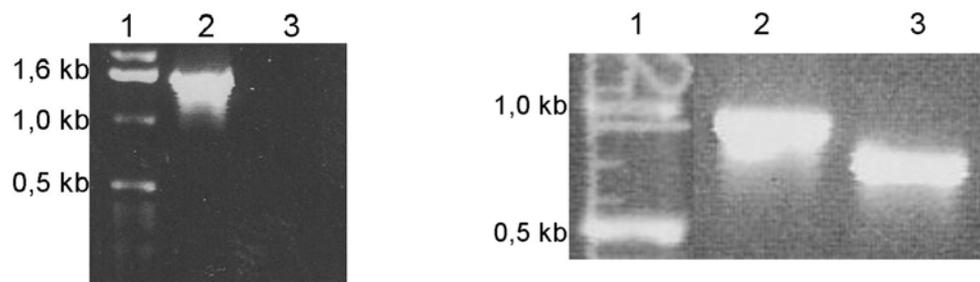


Abb. 3.6: PCRs mit genomischer DNA oder cDNAs von *F. graminearum* als Template (links: Primer *cel6uni2* und *cel6rev2*, rechts: Primer *cel6uni2* und *cel6rev3*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 1600 bp (links, Fragmentgröße 1581 bp) und ca. 900 bp (rechts, Fragmentgröße 872 bp). Die Spur 3 (links, PCR mit cDNA als Template) zeigt keine Bande, während die Spur 3 (rechts) die Bande des Amplikons der PCR mit cDNA als Template bei ca. 700 bp zeigt (Fragmentgröße 721 bp). Die in den Spuren 3 eingesetzten cDNAs wurden aus Mycel nach 48 h (links) und 96 h (rechts) Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Des weiteren wurde untersucht, ob das *cel6*-Gen transkribiert wird, wenn keine Induktoren (Cellulose oder Weizenzellwand) oder Inhibitoren (Glucose) der Transkription von Cellulasen als Kohlenstoffquellen verwendet werden. Sowohl bei der Verwendung von Sorbitol als auch bei der Verwendung von Xylan als Kohlenstoffquelle konnten keine Transkripte des *cel6*-Gens nach 48 oder 96 h Wachstum gefunden werden (Tab. 3.2).

Um zu untersuchen, ob die Cellulase Cel6 eine Rolle bei der Infektion von Weizenpflanzen durch *F. graminearum* spielt, wurde in infizierten Weizenähren

Ergebnisse

nach Transkripten des *cel6*-Gens gesucht. Es konnten in infizierten Ähren 14 d nach der Inokulation (p.i.) Transkripte des *cel6*-Gens gefunden werden (Abb. 3.7).

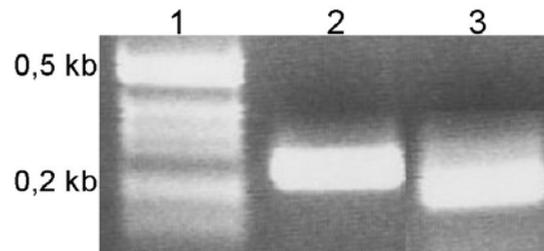


Abb. 3.7: PCRs mit genomischer DNA von *F. graminearum* oder cDNA infizierter Weizenähren (14 d p.i.) als Template (Primer *cel6inv2* und *cel6rev2*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit genomischer DNA als Template bei ca. 250 bp (Fragmentgröße 255 bp). Die Spur 3 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit cDNA als Template bei ca. 200 bp (Fragmentgröße 199 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

In der Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Transkription des *cel6*-Gens zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3.2: Transkription des *cel6*-Gens *in planta* (infizierte Weizenähren 14 d p.i.) und nach 48 und 96 h Wachstum von *F. graminearum* in Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (über RT-PCRs nachgewiesen). ZW = Weizenzellwand.

Kohlenstoffquelle	48 h	96 h
Glucose	—	—
Sorbitol	—	—
Xylan	—	—
Cellulose	+	+
ZW	—	+
<i>in planta</i>		+

3.1.1.3 Proteinsequenz der Cellulase 6 (Cel6)

Die kodierende Sequenz des *cel6*-Gens (Kapitel 3.1.1.1) lässt sich in eine Proteinsequenz (Cel6) von 457 Aminosäuren übersetzen (Abb. 3.8). Die Proteinsequenz der Cel6 aus *F. graminearum* weist eine Identität von 82 % zur Endoglucanase B aus *F. oxysporum* (GenBank P46236) und von 63 % zur Exocellobiohydrolase II aus *T. reesei* (GenBank P07987) auf.

```
MTAYKLFLAAAF AATALAAPVEERQSCSNGVWSQCGGQNWSGTPCCTSGNKCVKVND FYSQC  
QPGSADPSPTSTIVSATTTKATTTGSGGSVTSPPPVA TNNPFSGVDLWANNYYRSEVSTLAI  
PKLSGAMATAAAKVADVPSFQWMDTYDHI SFMEDSLADIRKANKAGGNYAGQFVVYDL PDRD  
CAAAA SNGEYSLDKDGKNKYKAYIADQGI LQDYS DTRI I LVI EPDSL ANMVTNMNVPKCAN A  
ASAYKELT I HALKELNLPNVSMYIDAGHGGWLGWPANLPPAAQLY GQLYKDAGKPSRLRGLV  
TNVSNYN AWKLSSKPDYTESNPNYDEQKYIHALS PLLEQEGWPGAKFIVDQGRSGKQPTGQK  
AWGDWCNAPGTGFGLRPSANTGDALVDAFVWVKPGGESDGTSDTSAARYDYHCGIDGAVKPA  
PEAGTWFQAYFEQLLKNANPSFL
```

Abb. 3.8: Proteinsequenz (457 Aminosäuren) der Cel6. Die grau hinterlegten Bereiche sind das Signalpeptid (Aminosäuren 1-18), das CBM (Aminosäuren 31-63) und die katalytische Domäne (Aminosäuren 111-423). Das 47 Aminosäuren lange Linkerpeptid ist hervorgehoben, die Prolin- (P), Serin- (S) und Threoninreste (T) sind unterstrichen. Die wahrscheinlichen aktiven Aminosäuren (in der Abbildung hervorgehoben und unterstrichen) sind Asp₁₈₆ und Asp₂₃₁.

Die übersetzte Proteinsequenz des *cel6*-Gens (Cel6) besitzt vor dem Export aus der Zelle drei funktionale Regionen (Abb. 3.8). Die Aminosäuren eins bis 18 (erste Region) bilden ein Signalpeptid, das den Export des Enzyms steuert und bei diesem Prozess wahrscheinlich abgespalten wird (das extrazelluläre Enzym besteht daher nur aus 439 Aminosäuren). Das Signalpeptid wurde mit Hilfe des SignalP-Programms vorhergesagt [Heijne, 1985; Nielsen *et al.*, 1997]. Die Wahrscheinlichkeit eines Signalpeptids wurde mit 100 %, die Wahrscheinlichkeit der Spaltungsstelle zwischen den Aminosäuren 18 und 19 mit 96 % angegeben (Abb. 3.9, rote Linie). Alle drei Regionen von Signalpeptiden nach Heijne lassen sich finden: die N-terminale, geladene Region (N-Region, Aminosäuren 1-5, in Abb. 3.9 grün), die hydrophobe Region (H-Region, Aminosäuren 6-13, in Abb. 3.9 blau) und die polare Region (C-Region, Aminosäuren 14-18, in Abb. 3.9 violett).

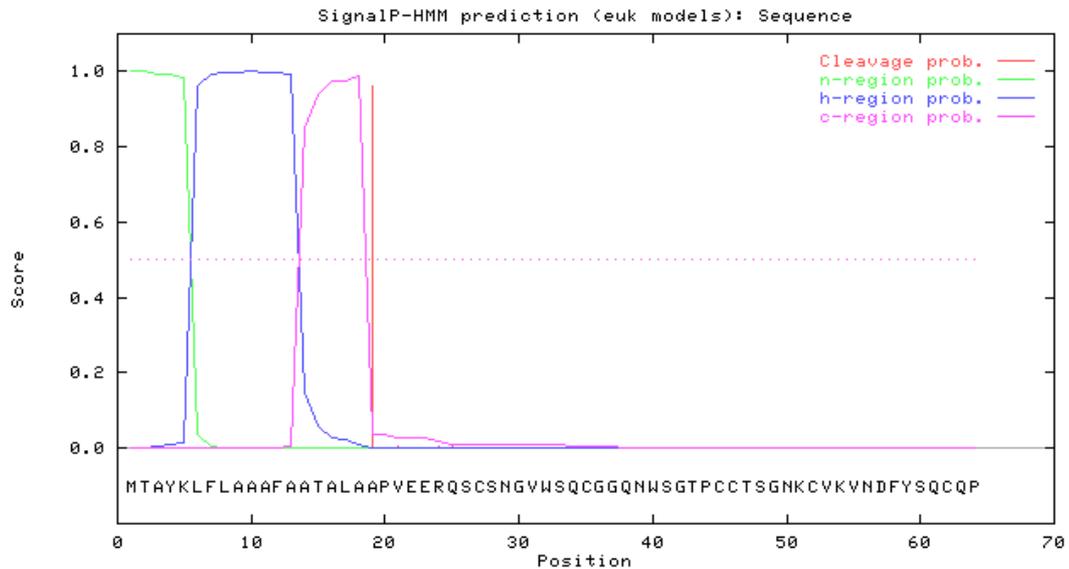


Abb. 3.9: Ausgabe des SignalP-Programms zur Vorhersage des Signalpeptides der Cel6. Die N-terminale geladene Region (n-Region, grüne Linie), die hydrophobe Region (h-Region, blaue Linie) und die polare Region (c-Region, violette Linie) in Signalpeptiden lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen. Die rote Linie gibt die wahrscheinliche Spaltungsstelle des Signalpeptides zwischen den Aminosäuren 18 und 19 an [Heijne, 1985; Nielsen *et al.*, 1997]. Quelle: Ausgabe des SignalP-Programms.

Die Aminosäuren 31-63 (zweite Region) bilden die Domäne eines N-terminalen „Carbohydrate binding module“ (CBM). Dieses Modul gehört der Familie I der CBMs an [CAZy-Datenbank; Linder und Teeri, 1997]. Abb. 3.10 zeigt ein Alignment von vier CBMs der Familie I aus *T. reesei* (CBHII, GenBank P07987 und CBHI GenBank P00725), *F. oxysporum* (Endoglucanase B, GenBank P46236), *F. graminearum* (Cel6, s. Abb. 3.8) und der Prosite Signatur (PS00562). Die Prosite Signatur (PS00562) für pilzliche CBDs (CBMs der Familie I, C-G-G-x(4,7)-G-x(3)-C-x(5)-C-x(3,5)-[NHG]-x-[FYWM]-x(2)-Q-C) wird von allen vier CBMs erfüllt (Cel6 CGGQNWSGTPCCTSGNKC VKV NDFYSQC, Abb. 3.10). Die für die Bindung der CBMs an Cellulose wichtigen aromatischen Aminosäuren (in Abb. 3.10 grau hinterlegt) sind ebenso konserviert, wie die an den Disulfidbrücken beteiligten Cysteinreste (in Abb. 3.10 mit einem Pfeil markiert) [Hoffren *et al.*, 1995; Linder und Teeri, 1997].

```
          ↓           ↓           ↓           ↓
GRA CEL6   VWSQCGGQNWSGTPCCTSGNKC VKVND FYSQCQ
TRI CBHII  CSSVWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYYSQCL
TRI CBHI   TQSHYGQCGGIGYSGPTVCASGTTCQVLNPFYYSQCL
OXY EGLB   VWAQCGGQNWSGTPCCTSGNKC VKLND FYSQCQ
PROSITE    CGGxxxxGxxx CxxxxxCxxxNxFxxQC
                                     Y
```

Abb. 3.10: Alignment von vier CBMs der Familie I aus *F. graminearum* (GRA, Cel6), *T. reesei* (TRI, CBHI, GenBank P00725 und CBHII, GenBank P07987), *F. oxysporum* (OXY, EGLB, GenBank P46236) und der Prosite Signatur (PS00562) für pilzliche CBMs. Aromatische Reste mit wahrscheinlicher Beteiligung an der Bindung von Cellulose sind grau hinterlegt, Cysteinreste zur Bildung von Disulfidbrücken sind mit einem Pfeil markiert [Hoffren *et al.*, 1995; Linder und Teeri, 1997].

Das 3D-Modell des CBMI der Cel6 zeigt die Lage der wahrscheinlich an der Bindung von Cellulose beteiligten aromatischen Aminosäuren (Abb. 3.11).

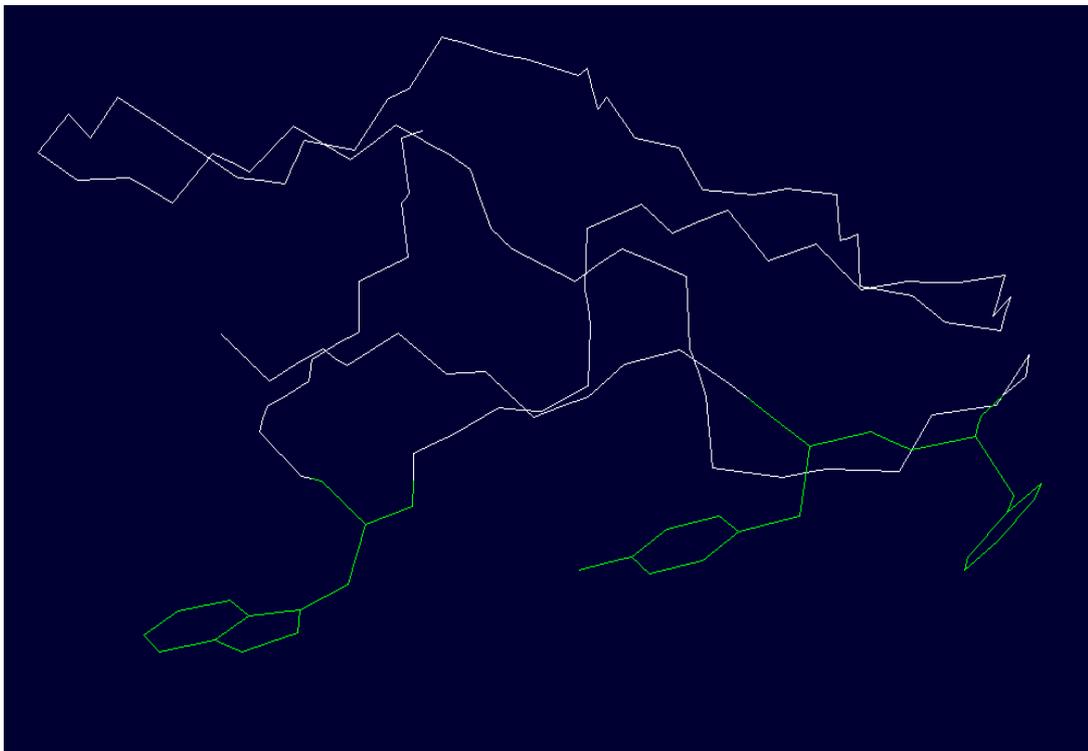


Abb. 3.11: 3D-Modell des CBMI der Cel6 aus *F. graminearum*. Die drei vermutlich an der Bindung von Cellulose beteiligten aromatischen Aminosäuren sind in grün dargestellt. Quelle: erstellt mit DeepView nach einer Berechnung des SwissProt-Servers (Kapitel 2.5).

Die Aminosäuren 111-423 (dritte Region) bilden mit der katalytischen Domäne die größte Region des Enzyms. Die beiden GH-Familie 6 Prosite Signaturen eins (Signatur PS00655: V-x-Y-x(2)-P-x-R-D-C-[GSAF]-x(2)-[GSA](2)-x-G) und zwei (Signatur PS00656: [LIVMYA]-[LIVA]-[LIVT]-[LIV]-E-P-D-[SAL]-[LI]-[PSAG]) lassen sich in der katalytischen Domäne der Cel6 wiederfinden (Signatur 1 VVYDLPDRDCAAAASNG und Signatur 2 ILVIEPDSL A). Die in der GH-Familie 6 konservierten katalytischen Aminosäuren konnten ebenfalls identifiziert werden (Asp₁₈₆ und Asp₂₃₁, Abb. 3.8).

Das CBM und die katalytische Domäne sind durch einen 47 Aminosäuren langen Linker verbunden (Abb. 3.8). Der Linker ist reich an den Aminosäuren Prolin (15 %), Serin (17 %) und Threonin (21 %), die zusammen 53 % aller Aminosäuren des Linkerpeptids ausmachen.

Abbildung 3.12 zeigt ein Alignment der Proteinsequenzen der Cel6 aus *F. graminearum* und der Endoglucanase B aus *F. oxysporum* (GenBank P46236). Die Identität der Proteinsequenzen der beiden Cellulasen beträgt 82 %. Das Signalpeptid, das CBM und die katalytische Domäne befinden sich in den Proteinen von *F. oxysporum* und *F. graminearum* an den gleichen Stellen (in Abb. 3.12 grau hinterlegt). Das Linkerpeptid zwischen dem CBM und der katalytischen Domäne zeigt eine geringere Identität (57 %) als der Rest der Proteinsequenz (86 %). Der Anteil von Prolin-, Serin- und Threoninresten ist im Linkerpeptid von *F. oxysporum* ebenfalls erhöht (49 % aller Aminosäuren des Linkers).

Ergebnisse

gra	MTAYKLFLLAAFAATALAAPVEERQSCSNGVWSQCGGQNWSGTPCCTSGNKCVKVNDFYS	60
oxy	-MAYKLILAA-FAATALAAPVEERQSCSNGVWVAQCGGQNWSGTPCCTSGNKCVKLNDFYS	58
	**** ** *****	
gra	QCQPGSADPSPTST-IVSATTTKATTTG-----SGGSVTSPPPVAATNNPFGVDLWANNY	114
oxy	QCQPGSAEPSSTAAGPSSTTATKTTATGGSSTTAGGSVTSAPPAASDNPYAGVDLWANNY	118
	***** ** *	
gra	YRSEVSTLAI PKLSGAMATAAAKVADVPSFQWMDTYDHISFMEDSLADIRKANKAGGNYA	174
oxy	YRSEVMNLA VPKLSGAKATAAAKVADVPSFQWMDTYDHISLMEDTLADIRKANKAGGKYA	178
	***** ** *****	
gra	GQFVVYDLPDRDCAAAAANGEYSLDKDKGNKYKAYIAD-QGILQDYS DTRIILVIEPDSL	233
oxy	GQFVVYDLPNRDCAAAAANGEYSLDKDKGANKYKAYIAIKGILQNYSDTKVILVIEPDSL	238
	***** *****	
gra	ANMVTNMMNPKCANAA SAYKELTIHALKELNLPNVS MYIDAGHGGWLGWPANLPPAAQLY	293
oxy	ANLVTNLNVDKCAKAESAYKELTVYAIKELNLPNVS MYLDAGHGGWLGWPANIGPAAKLY	298
	** *** ** *** * ***** * ***** ***** ***** ** **	
gra	GQLYKDAGKPSRRLRGLVTNVS NYNAWKLSSKPDYTESNPNYDEQKYIHALSPILLEQEGWP	353
oxy	AQIYKDAGKPSRVRGLVTNVS NYNGWKLSTKPDYTESNPNYDEQRYINAFAPLLAQEGWS	358
	* ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** * ** * ** *	
gra	GAKFIVDQGRSGKQPTGQKAWGDCNA PGTGFGLRPSANTGDALVDAFVWVKPGGESDGT	413
oxy	NVKFIVDQGRSGKQPTGQKAQGDWCNAKGTGFGLRPSNTGDALADAFVWVKPGGESDGT	418
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
gra	SDTSAARYDYHCGIDGAVKPAPEAGTWFQAYFEQLLNANPSFL	457
oxy	SDTSAARYDYHCGLDDALKPAPEAGTWFQAYFEQLLDNANPSFL	462
	***** * * ***** *****	

Abb. 3.12: Aminosäurealignment der Cel6 aus *F. graminearum* (gra) und der Endoglucanase B (GenBank P46236) aus *F. oxysporum* (oxy). Die Signalpeptide, die CBMs und die katalytischen Domänen sind grau hinterlegt. Die Linkerpeptide sind hervorgehoben, die Prolin- (P), Serin- (S) und Threoninreste (T) sind unterstrichen. Identische Aminosäuren sind mit einem * markiert.

Die Zugehörigkeit einer Cellulase zu einer bestimmten GH-Familie gibt noch keine eindeutige Auskunft darüber, ob es sich um eine Endo- oder Exocellulase handelt, zumal in der GH-Familie 6 sowohl Exo- als auch Endocellulasen beschrieben sind. Exo- und Endocellulasen unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Während das aktive Zentrum von Endocellulasen in einer offenen Grube liegt (die Cellulosekette kann an jeder Stelle in das aktive Zentrum gelangen), befindet sich das aktive Zentrum von Exocellulasen in einem Tunnel (Celluloseketten können nur vom Ende her in das aktive Zentrum gelangen) [Varrot *et al.*, 1999a/b; Davies *et al.*, 2000; Munoz *et al.*, 2001; Sandgren *et al.*, 2001]. Um festzustellen, ob es sich bei der Cel6 um eine Endo- oder Exocellulase handelt, wurde mit Hilfe des SwissProt-Servers ein 3D-Modell der katalytischen Domäne der Cel6 berechnet und mit dem Programm RasWin graphisch dargestellt (Abb. 3.13).



Abb. 3.13: 3D-Modell der katalytischen Domäne der Cel6 aus *F. graminearum*. Das aktive Zentrum befindet sich in einem Tunnel. Quelle: erstellt mit RasWin nach einer Berechnung des SwissProt-Servers.

Das 3D-Modell der katalytischen Domäne zeigt, dass das aktive Zentrum in einem Tunnel liegt. Diese Struktur verhindert die Anlagerung des Enzyms an die inneren Bereiche einer Cellulosekette. Cellulosemoleküle können nur von den Kettenenden her in den Tunnel eintreten, was dem Prinzip einer Exocellulase entspricht.

3.1.2 Die Gene der Cellulasen der GH-Familien 7 und 45

In dem in dieser Arbeit verwendeten *F. graminearum* Stamm K59 wurden neben dem Gen einer Cellulase der GH-Familie 6 (Kapitel 3.1.1) drei weitere Cellulasegene identifiziert und sequenziert (Kapitel 3.1.2.1). Es handelt sich dabei um zwei Gene von Cellulasen der GH-Familie 7 (*cel7A* und *cel7B*) sowie um ein Gen einer Cellulase der GH-Familie 45 (*cel45*). Neben der Transkription der drei Cellulasegene (Kapitel 3.1.2.2) wurden auch die aus den kodierenden Sequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen (Kapitel 3.1.2.3) analysiert.

3.1.2.1 Sequenzen des *cel7A*-, *cel7B*- und *cel45*-Gens

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Sequenzierungen der drei Cellulasegene *cel7A* (Kapitel 3.1.2.1.1), *cel7B* (Kapitel 3.1.2.1.2) und *cel45* (Kapitel 3.1.2.1.3) vorgestellt.

3.1.2.1.1 Sequenz des *cel7A*-Gens

Um ein potentiell Gen einer Cellulase der GH-Familie 7 im Genom von *F. graminearum* zu finden, wurden die Nukleotidsequenzen zweier Cellulasen der GH-Familie 7 von *F. oxysporum* (GenBank L29379 und L29378) über das Internetprogramm ClustalW verglichen (nicht gezeigt). Aus zwei Bereichen größerer Ähnlichkeit wurden die heterologen Primer *cel7uni1* und *cel7rev1* abgeleitet (Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Eine PCR mit den Primern *cel7uni1* und *cel7rev1* sowie genomischer DNA von *F. graminearum* amplifizierte zwei Fragmente von ca. 450 und 500 bp Länge (nicht gezeigt).

Die Sequenzierung der Fragmente ergab für das größere Fragment (494 bp) eine Identität von 80 % zur Nukleotidsequenz des *F. oxysporum* „C-family cellulase homologue 2“ Gens (GH-Familie 7, Genbank L29379) und für das kleinere Fragment (426 bp) eine Identität von 71 % zur Nukleotidsequenz des *F. oxysporum* „C-family cellulase homologue 1“ Gens (GH-Familie 7, GenBank L29378). Damit konnten mit dem Primerpaar *cel7uni1* und *cel7rev1* zwei verschiedene Gene von Cellulasen der GH-Familie 7 im Genom gefunden werden. Die Gene wurden *cel7A* und *cel7B* genannt (für *cel7B* vgl. Kapitel 3.1.2.1.2).

Die vollständige Sequenzierung des *cel7A*-Gens aus *F. graminearum* erfolgte über zwei weitere PCR Schritte (*cel7auni1* und *cel7arev1* sowie *cel7auni2* und *cel7rev1*, s. Anhang Tab. A.1) sowie einem inversen PCR Schritt (Primer *cel7ainv1* und *cel7ainv2*, s. Anhang Tab. A.1). Die vollständige genomische Sequenz des *cel7A*-Gens ist 1649 bp lang (GenBank AY342396, s. Anhang Abb. A.1).

Durch die Sequenzierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA des *cel7A*-Gens konnten zwei Introns mit einer Länge von 52 und 58 bp identifiziert werden. Die kodierende Sequenz des *cel7A*-Gens ist damit 1539 bp lang. Sie ist zu 84 % mit der kodierenden Sequenz des *F. oxysporum* „C-family cellulase homologue 2“ Gens (GenBank L29379) identisch.

Die zwei Introns des *cel7A*-Gens wurden mit Konsensussequenzen für Introns in filamentösen Pilzen [Gurr *et al.*, 1987] und Fusarien [Brown *et al.*, 2001] verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Intronlängen als auch die internen Verzweigungsstellen den Konsensussequenzen entsprechen (Kapitel 3.3). Beide Introns liegen in dem Bereich der typischen Intronlänge von ca. 60 bp mit einer Spanne zwischen 49 und 90 bp in Fusarien [Brown *et al.*, 2001].

3.1.2.1.2 Sequenz des *cel7B*-Gens

Die Ableitung der heterologen Primer und die Sequenzierung eines 426 bp großen Fragments des *cel7B*-Gens sind bereits beschrieben worden (Kapitel 3.1.2.1.1).

Die vollständige Sequenzierung des *cel7B*-Gens aus *F. graminearum* K59 erfolgte über einen inversen PCR Schritt (Primer *cel7binv1* und *cel7binv2*, s. Anhang Tab. A.1) und über Primer aus der Mitte 2003 veröffentlichten Sequenz des Genoms von *F. graminearum* PH-1 (*cel7buni1* und *cel7brev2* sowie *cel7binv2* und *cel7brev1*, s. Anhang Tab. A.1). Die vollständige genomische Sequenz des *cel7B*-Gens ist 1357 bp lang (s. Anhang Abb. A.3).

Durch die Sequenzierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA des *cel7B*-Gens konnte ein Intron mit einer Länge von 52 bp identifiziert werden. Die kodierende Sequenz des *cel7B*-Gens ist 1305 bp lang. Sie ist zu 76 % mit der kodierenden Sequenz des *F. oxysporum* „C-family cellulase homologue 1“ Gens (GH-Familie 7, GenBank L29378) identisch.

Das Intron des *cel7A*-Gens wurde mit Konsensussequenzen für Introns in filamentösen Pilzen [Gurr *et al.*, 1987] und Fusarien [Brown *et al.*, 2001] verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Introngrenze als auch die interne Verzweigungsstelle den Konsensussequenzen entspricht (Kapitel 3.3). Das Intron liegt in dem Bereich der typischen Intronlänge von ca. 60 bp mit einer Spanne zwischen 49 und 90 bp in Fusarien [Brown *et al.*, 2001].

3.1.2.1.3 Sequenz von *cel45*-Gens

Um ein potentiell Gen einer Cellulase der GH-Familie 45 im Genom von *F. graminearum* zu finden, wurden die Nukleotidsequenzen zweier Cellulasen der GH-Familie 45 von *F. oxysporum* (GenBank L29381) und *Humicola insolens* (GenBank A23635) über das Internetprogramm ClustalW verglichen (nicht gezeigt). Aus zwei Bereichen größerer Ähnlichkeit wurden die heterologen Primer *cel45uni1* und *cel45rev1* abgeleitet (s. Anhang Tab. A.1). Eine PCR mit den Primern *cel45uni1* und *cel45rev1* sowie genomischer DNA von *F. graminearum* amplifizierte ein Fragment von ca. 600 bp Länge (nicht gezeigt).

Die Sequenzierung des Fragments (574 bp) ergab eine Identität von 77 % zur Sequenz des *F. oxysporum* „K-family“ Cellulasegens (GH-Familie 45, GenBank L29381).

Die vollständige Sequenzierung des *cel45*-Gens aus *F. graminearum* erfolgte über einen inversen PCR Schritt (Primer *cel45inv1* und *cel45inv2*, s. Anhang Tab. A.1). Die vollständige genomische Sequenz des *cel45*-Gens ist 1127 bp lang (s. Anhang Abb. A.5).

Durch die Sequenzierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA des *cel45*-Gens konnte ein Intron mit einer Länge von 59 bp identifiziert werden. Die kodierende Sequenz des *cel45*-Gens ist 1068 bp lang. Sie ist zu 82 % mit der kodierenden Sequenz des *F. oxysporum* „K-family“ Cellulasegens (GH-Familie 45, GenBank L29381) identisch.

Das Intron des *cel45*-Gens wurde mit Konsensussequenzen für Introns in filamentösen Pilzen [Gurr *et al.*, 1987] und Fusarien [Brown *et al.*, 2001] verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Introngrenze als auch die interne Verzweigungsstelle den Konsensussequenzen entspricht (Kapitel 3.3). Das Intron liegt in dem Bereich der typischen Intronlänge von ca. 60 bp mit einer Spanne zwischen 49 und 90 bp in Fusarien [Brown *et al.*, 2001].

3.1.2.2 Transkription des *cel7A*-, *cel7B*- und *cel45*-Gens

Untersuchungen der Transkription der drei Cellulasegene ergaben, dass die Gene *cel7A*, *cel7B* und *cel45* nur unter bestimmten Bedingungen transkribiert werden und damit ebenso wie das *cel6*-Gen (Kapitel 3.1.1.2) einer Regulation auf Transkriptionsebene unterliegen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Transkription der Cellulasegene *cel7A*, *cel7B* und *cel45 in planta* (infizierte Weizenähren) und nach 48 und 96 h Wachstum von *F. graminearum* in Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (über RT-PCRs nachgewiesen). ZW = Weizenzellwand, n.d. = nicht detektiert.

<i>cel7A</i>			<i>cel7B</i>			<i>cel45</i>		
	48 h	96 h		48 h	96 h		48 h	96 h
Glucose	—	—	Glucose	—	—	Glucose	+	—
Cellulose	+	+	Cellulose	+	—	Cellulose	+	n.d.
ZW	+	+	ZW	+	+	ZW	—	+
<i>in planta</i>	+ (21 d p.i.)		<i>in planta</i>	—		<i>in planta</i>	+ (28 d p.i.)	

Mit Ausnahme des *cel45*-Gens nach 48 h wurde keines der drei Cellulasegene nach 48 oder 96 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle transkribiert. Die Transkription in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle konnte bei allen drei Cellulasegenen nach 48 h Wachstum festgestellt werden, während nur das *cel7A*-Gen auch nach 96 h Wachstum noch transkribiert wurde. Eine Transkription in Minimalmedium mit Weizenzellwand konnte mit Ausnahme des *cel45*-Gens (nach 48 h Wachstum nicht transkribiert) sowohl nach 48 als auch nach 96 h Wachstum des Pilzes nachgewiesen werden. Bei zwei der drei Cellulasegene (*cel7A* und *cel45*) konnte zudem eine Transkription *in planta* nachgewiesen werden (Tab 3.3).

3.1.2.3 Proteinsequenzen der Cellulasen 7A (Cel7A), 7B (Cel7B) und 45 (Cel45)

Aus den kodierenden Sequenzen der drei Cellulasegene (Kapitel 3.1.2.1) wurden die Proteinsequenzen der kodierten Cellulasen abgeleitet (Cel7A mit 512 Aminosäuren, Cel7B mit 434 Aminosäuren und Cel45 mit 355 Aminosäuren, Proteinsequenzen s. Anhang Abb. A.2, A.4 und A.6).

Die Proteinsequenzen der beiden Cellulasen der GH-Familie 7 weisen hohe Homologien zu anderen Cellulasen der GH-Familie 7 auf. Cel7A ist zu 85 % mit der Proteinsequenz der Exocellobiohydrolase I aus *F. oxysporum* (GH-Familie 7, GenBank P46238) und zu 65 % mit der Proteinsequenz einer Cellobiohydrolase aus *H. grisea* (GH-Familie 7, GenBank BAA09785) identisch. Cel7B zeigt eine Identität von 73 % zur Proteinsequenz der Endoglucanase Typ C aus *F. oxysporum* (GH-Familie 7, GenBank P46237) und eine Identität von 54 % zur Proteinsequenz einer Cellulase aus *Melanocarpus albomyces* (GH-Familie 7, GenBank CAD56666).

Die Proteinsequenz der Cel45 weist eine Identität von 78 % zur Sequenz der Endoglucanase Typ K aus *F. oxysporum* (GH-Familie 45, GenBank P45699) und eine Identität von 60 % zu einem hypothetischen Protein aus *N. crassa* (GenBank XP_324478) auf.

Alle drei Cellulasen zeichnen sich durch ein Signalpeptid aus, das für den Export der Enzyme sorgt und bei diesem Prozess wahrscheinlich abgespalten wird [Heijne, 1985]. Die extrazellulären Enzyme sind daher um 17 (Cel7A), 18 (Cel7B) und 17 (Cel45) Aminosäuren verkürzt. Ein über ein Linkerpeptid mit der katalytischen Domäne verbundenes, C-terminales „Carbohydrate binding module“ der Familie I (CBM) findet sich sowohl in Cel7A (Aminosäuren 480-512) als auch in Cel45 (Aminosäuren 318-353), während ein CBM in Cel7B fehlt. Die Linkerpeptide sind reich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin (Cel45 36 %; Cel7A 54 % der Aminosäuren des Linkerpeptids). Die katalytischen Domänen lassen sich den GH-Familien 7 (Cel7A, Aminosäuren 19-453 und Cel7B, Aminosäuren 20-423) und 45 (Cel45, Aminosäuren 21-220) zuordnen.

Die Berechnung von 3D-Modellen der katalytischen Domänen (nicht gezeigt) ergab, dass es sich bei den Cellulasen Cel7B und Cel45 mit hoher Wahrscheinlichkeit um Endocellulasen handelt (aktives Zentrum befindet sich in einer offenen Grube), während die Form des aktiven Zentrums der Cel7A auf eine Exocellulase schließen lässt (aktives Zentrum befindet sich in einem Tunnel).

3.2 *Der Transkriptionsfaktor ACEI*

Cellulasen unterliegen wie die Gene anderer zellwandabbauender Enzyme in der Regel einer Regulation auf Transkriptionsebene (Kapitel 3.1). Die Regulation wird über die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotoren dieser Gene vermittelt [Lynd *et al.*, 2002].

Der Transkriptionsfaktor ACEI ist an der Regulation von Cellulasen und Xylanasen beteiligt, wobei bisher unklar ist, ob er einen aktivierenden oder reprimierenden Effekt auf die Transkription seiner Zielgene hat [Saloheimo *et al.*, 2000; Aro *et al.*, 2003].

Um die Rolle des Transkriptionsfaktors ACEI in *F. graminearum* in Bezug auf die Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen sowie auf die Virulenz bzw. Pathogenität des Pilzes untersuchen zu können, wurde das *ace1*-Gen zunächst sequenziert (Kapitel 3.2.1) und seine Transkription charakterisiert (Kapitel 3.2.2). Die Eigenschaften der aus der Nukleotidsequenz des *ace1*-Gens übersetzten Proteinsequenz und die Möglichkeit eines alternativen Spleißens der *ace1*-Introns werden in den Kapiteln 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben. Über einen „knock-out“ des *ace1*-Gens konnte die Rolle des ACEI-Faktors in der Regulation von Cellulase- und Xylanasegenen beleuchtet und seine Rolle in der Virulenz bzw. Pathogenität des Pilzes untersucht werden (vg. Kapitel 3.2.5).

3.2.1 **Sequenz des *ace1*-Gens**

Um das potentielle Gen eines ACEI-Faktors im Genom von *F. graminearum* zu finden, wurden die Nukleotidsequenzen des *ace1*-Gens aus *T. reesei* (GenBank AF190793) und des Gens eines hypothetischen Proteins aus *N. crassa* (GenBank XM_332024) über das Internetprogramm ClustalW verglichen (nicht gezeigt). Aus

Ergebnisse

Bereichen erhöhter Homologie wurden die heterologen Primer ace1uni1 und ace1rev1 (s. Anhang Tab. A.1) abgeleitet. Eine PCR mit den Primern ace1uni1 und ace1rev1 sowie genomischer DNA von *F. graminearum* amplifizierte ein Fragment von ca. 300 bp (Abb. 3.14).

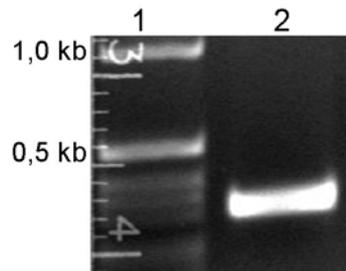


Abb. 3.14: PCR mit genomischer DNA von *F. graminearum* als Template (degenerierte Primer ace1uni1 und ace1rev1, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons bei ca. 300 bp (Fragmentgröße 305 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Sequenzierung des Fragments ergab 305 bp mit einer Identität von 81 % zur Nukleotidsequenz des *ace1*-Gens aus *T. reesei*. Die vollständige Sequenzierung des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* erfolgte über mehrere inverse PCR Schritte (inverse PCR mit den Primern ace1inv1 und ace1inv2 Abb. 3.15, weitere inverse PCR Schritte s. Anhang Tab. A.2, Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Die vollständige genomische Sequenz des *ace1*-Gens ist 2340 bp lang (Abb. 3.16). Die Identität der genomischen Sequenzen der *ace1*-Gene aus *T. reesei* und *F. graminearum* beträgt 69 %. In dem *ace1*-Gen aus *T. reesei* konnte ein Intron von 228 bp Länge 5' vom Startcodon identifiziert werden [Saloheimo *et al.*, 2000]. Um zu überprüfen, ob auch das *ace1*-Gen aus *F. graminearum* ein solches Intron enthält, wurden 742 bp 5' vom Startcodon des *ace1*-Gens sequenziert (Abb. 3.16). Die Identität der 5' Bereiche der *ace1*-Gene aus *T. reesei* und *F. graminearum* beträgt 5 %.

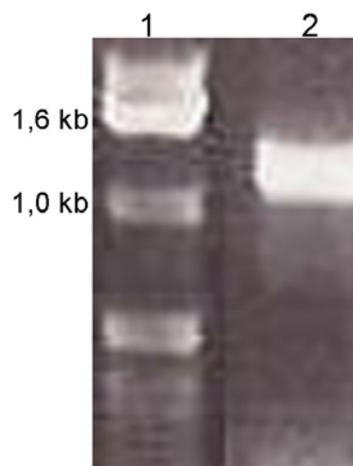


Abb. 3.15: Inverse PCR mit zirkularisierter DNA von *F. graminearum* als Template (*Xho*I-Verdau, Kapitel 2.3.3, Primer *ace1inv1* und *ace1inv2*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons bei ca. 1200 bp. Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Durch die Sequenzierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA des *ace1*-Gens konnten drei Introns mit einer Länge von 291, 63 und 51 bp identifiziert werden. Das erste Intron liegt 5' vom Startcodon (Intron 1: -356 bis -66 bp), die Introns zwei und drei liegen 3' vom Startcodon (Intron 2: bp 748-810, Intron 3: bp 1026-1076). Für die kodierende Sequenz des *ace1*-Gens ergibt sich eine Länge von 2226 bp (Abb. 3.16).

Ergebnisse

```
CACACGCCCTGACTGCGGAATTGTGCACCCCTCTCTATCAACTCATATTATAGTTGCCCTGTTCCGCC  
CGTCCGTCCGTCTTGATATTTCTCTCCAATTCCACCCGCCCTTTCCATCGCAACGCAACGCAACGCAT  
CACAGTGCAGCGCAACGAAACGAAACACAGCACAGACGTTCTACCGTCTGTATTTCAAATCGATACTC  
GTCGTTTGGACGTAGCTCATCGTGTGTTTTTTTTTTTTTAATCAATCTACCGCCAGAGGAAGTCATAA  
TCAGTCCGAGTCGCTCGTTACTCGCCTTCCCTGTCAATCCCGCGCCACCTGCATCACATTGGCTCGCCG  
ACGTAAAGCTGATCAATCCTCGGTCACTTTTTTTCATCTCTGACCTGGTACGGTTAACATTTTATCTCA  
TTTTCTACATCTGGTTCTTCGTCTCTTGACGTGACTATTATCTTTTTTTTACGTTCTACTGGCATCGC  
TTTCAATCGTCAGCATTGGTCAATCAATCACCAGATACCTCAACCTGGCCTTGATCAACGCTCTGGGC  
CTTCGCCTTGCCTTTGCCCTGGGTGTGGGAGTTAGGAATGCCGACTGTGACTCACATCTCCGTCCCTT  
CACTGCCAAGCACCTGCTTGTATTCAAAGGTCAAGCTCTTGAACCTAACGGGACTCCCCGACTTAGCTT  
CAGGACACCTCTGGCCATCAGTCGACTGTCTTTTTTACCTCATACCCACCTTGCATCTAAGCCATGTC  
TTCTCCCACCTCGTCGAAGGACTCCGGTACTCGTCCGGACTGCGACACCCGAGAATGCCTTGTCTTT  
TAAGAACAGCTCTACCTCCGTAAGGGTGCACCTTCCACTCTCTACATCACCATCTTTGACTTCCG  
ACATTGCCTTTGTCCCTCCTACTTTGCCTCGAGCCAGTCCCATCTGGATGATGTCTCGATGCCAAC  
CGTCGACGTGTGGCCTTACTCTCAACGACATCGACGAGGCTCTTGCCAAGACCCAGAGCTCTCTCT  
GTCATCCACGTCAAAGCCCATGACTCTTCGACACCCGGTCTTCTATCCCTCGCGGCTTCTCGAGG  
GACCTATCGTCGATCCCAAGATGACAAAAGAAGAAGAGAGGCGCACCTGCGCCCCAGAGGCCGACT  
TCGCGGGCTCTTGAGGACCAATTCCGATAGCGGTTTGGGTACATCAGTAGCTTCCACAAAAGAGCG  
GGGCGGGTCACTGCATCAAAGGAGGCAAAGGTGAAAACACGATGCCTCACAAGATCCGCCGCCGCCG  
CCGAGCAACGGGGAAGCTCCCTTCACTGGGATCAAAGCTTTTCCAGCGTATTCACGAGCACACTTTA  
CGCCCTTTGTTGGCCAAGCCGACCCTAAAAGAGTTCAAGCCTATTGTGCTTGACATTCCTAGGAGAAT  
TCAATCAAAGGAAATTTATTTGCTTGCAGATCTTGAGAAAACCTGATCTTTATGGCACCAGTAAAGTC  
AGCTTCTGACTAATAATGGCGTTTGGGAAAATACTTATCGGACTTTGTCTTTAAAGGGAAGGCTAAA  
TCAGCAACCTTGTACCTGGATTTCTGCCTTACATCCGTCCGATGCATTCAGGCGACAGTCGAATATCT  
TAGCGACCGCAACAAATTCGACCCGACAGCCGGCTTACACTAACGGATACTTCTCGACCTTAAGG  
ATCAGATTTTAGAATACGGAAAACAATTTGCCGCCAAGAACAGCGCGCAGAAATGGATATCGACCG  
TATGATCCAGCTTTCGTTCCCTTGAACCACCCAACTAACTTGCACAAAAGATCTGATGAGATCAAGCT  
CGTCGGTGGCCTTTCTGTGAACGGTCTGCTGAGCTCGTTCGTGTTTCGCAAGGACGGCACTTACA  
TTTTCCCTGGACACTGGCAAGCCTGTGAGACAGACGACGACGCAATGAAAATGAAGCGCTCCCTT  
AGTCAACAGCTGGAGGATGAGGAGGAGATCCAGCGATCTATGGCTCGTCGCAAGAAGACGCTTCTCC  
CGAGGAACTGGCCCCAAGAAATGCCGTGAGCCTGGCTGCAACAAAGAGTTCAAGAGGCCATGCGATT  
TAACAAAGCACGAAAAAACCACTCTCGCCCTTGGAAAGTGCCTGTCTCGACTTGCAAGTACCACACC  
TATGGCTGGCCCACTGAGAAGGAGATGGATCGTCAACACAACGACAAGCACTCCGCTGCCCCGCCAT  
GTATGAGTGTCTGTTAAACCGTGCCTTACAAGTCAAAGCGTGAATCGAAGTGAAGCAACACATGG  
AGAAAGCTCACGGTTGGACCTACGTCCGAACCAAGACTAACGGCAAGAAGTTGCCCTCCATTGCTGGT  
AGCGTTTACGAGCAGACCCCCCTCTGGGCAACATGTGACACCATCTTCGATCGAATATAACAGTGT  
CCCCACGCCTCCTCAAAACGACGTAACGAGTTCGTGCGCAACGACTTCTCTTTACCCACCGATT  
CTGACTGGATGTGGTTAAACAATATCCCCGCTGAGGCAATGAACATCGATCTGACTCTTGATTCAACT  
TCGCCTGCTTCTGCTAGTTCTACGAGCAGTATGCGCCATATCAAAAACGGTTTCAAGTTTATCCTGGA  
CAACGAAGACCTACTAGTGTCTCATGCAACTTCCAGCTCACTTCCCTCGCTGAGCAAGCTGTTA  
TGTATAGCAACCTAAGATGATGCAACAGCAGCTGCCCATGTACCAGCAGGTTCTTCAACAAATTCCT  
CAGCCGATCCCTGTCCAAACTGCTCCATCTCAATTCTCGCAACCGGTCAGGAGACTGCCATGCTCTT  
CACCCCTAACTCACTGAGAGATGTTGATGAGGGGTTGATGACTCTTTTGGCGCAGACGGAATGGATT  
TTCCACTCTTTCCCGCGGTAATGGTATGGCCAAAGACCAACAATTATCAGCCGCTCTTTGGCGAGATT  
CCCAGTGCAAACGTGGGTTTCTCTCAAAACTCCAGGACCTTTCCAAATGATGGACTGGTCCAGTGG  
TGGATTTCTCGAAACCTTTGA
```

Abb. 3.16: Nukleotidsequenz des *ace1*-Gens (2340 bp) und 742 bp des Bereiches 5' vom Startcodon aus *F. graminearum*. Introns sind grau hinterlegt, Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Intronpositionen: Intron 1: -256- -66, Intron 2: 748-810, Intron 3: 1026-1076. Die Nukleotidsequenz ist in der GenBank Datenbank unter der Nummer AY504867 hinterlegt.

Die kodierende Sequenz des *ace1*-Gens weist eine Identität von 69 % zur kodierenden Sequenz des *ace1*-Gens aus *T. reesei* auf (GenBank AF190793).

Die drei Introns des *ace1*-Gens wurden mit Konsensussequenzen für Introns in filamentösen Pilzen [Gurr *et al.*, 1987] und Fusarien [Brown *et al.*, 2001] verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Intronengrenzen als auch die internen Verzweigungsstellen den Konsensussequenzen entsprechen (Kapitel 3.3). Zwei der drei Introns (Introns zwei und drei, Abb. 3.16) liegen in dem Bereich der typischen Intronlänge von ca. 60 bp mit einer Spanne zwischen 49 und 90 bp in Fusarien [Brown *et al.*, 2001]. Lediglich das erste Intron weicht mit seiner Länge von 291 bp davon ab.

3.2.2 Transkription des *ace1*-Gens

Transkriptionsfaktoren dienen zur Regulation anderer Gene und können auch selbst einer Regulation unterliegen. Um zu untersuchen, ob die Transkription des *ace1*-Gens konstitutiv erfolgt oder einer Regulation unterliegt, wurde die Transkription beim Wachstum des Pilzes in Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen untersucht.

Das *ace1*-Gen wurde nach 48 und 96 h Wachstum des Pilzes mit Glucose als Kohlenstoffquelle transkribiert (Abb. 3.17). Die Abbildungen zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA in den Spuren 2 und die Banden der Amplikons der PCRs mit den cDNAs in den Spuren 3. Die Banden der amplifizierten cDNA-Fragmente sind aufgrund ihrer geringeren Größe durch das Fehlen der Introns zwei und drei gut zu erkennen. In der Abbildung 3.17 (rechts) ist in Spur 3 ebenfalls die Bande eines Amplikons der genomischen Größe zu erkennen.

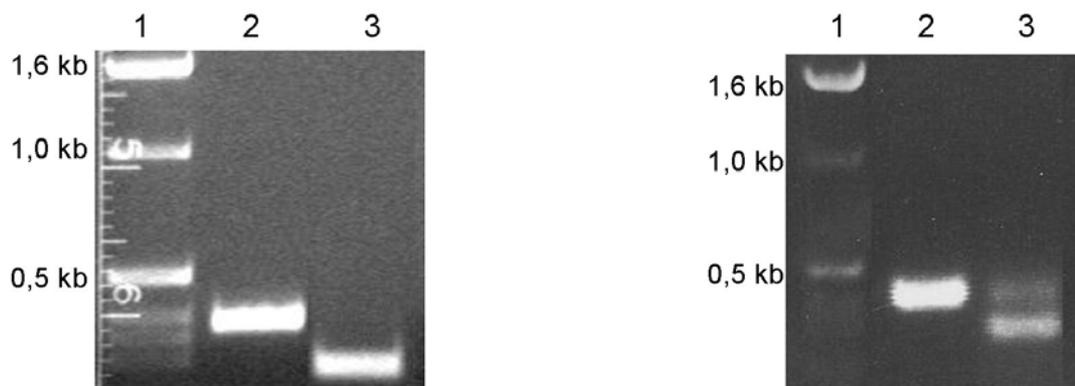


Abb. 3.17: PCRs mit genomischer DNA oder cDNAs von *F. graminearum* als Template (Primer ace1uni2 und ace1rev2, s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 400 bp (Fragmentgröße 390 bp). Die Spuren 3 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit cDNAs als Template bei ca. 300 bp (Fragmentgröße 276 bp). Die in den Spuren 3 eingesetzten cDNAs wurden aus Mycel nach 48 h (links) und 96 h (rechts) Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Wurde *F. graminearum* in Cellulose Typ 20 (CT20) angezogen, so konnten sowohl nach 48 als auch nach 96 h Wachstum Transkripte des *ace1*-Gens nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Wiederum sind die Banden der Amplikons der cDNAs aufgrund ihrer geringeren Größe leicht von den Banden der Amplikons der genomischen DNA zu unterscheiden.

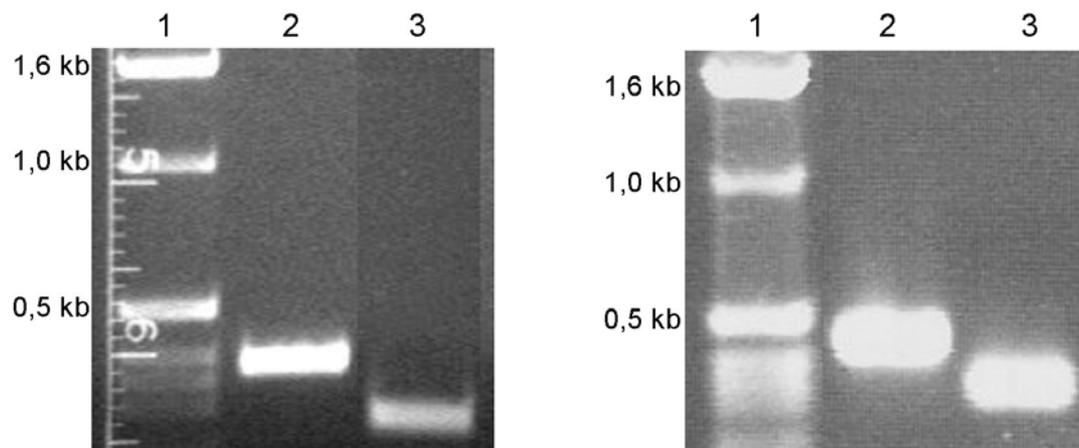


Abb. 3.18: PCRs mit genomischer DNA oder cDNAs von *F. graminearum* als Template (Primer *ace1uni2* und *ace1rev2*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 400 bp (Fragmentgröße 390 bp). Die Spuren 3 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit cDNAs als Template bei ca. 300 bp (Fragmentgröße 276 bp). Die in den Spuren 3 eingesetzten cDNAs wurden aus Mycel nach 48 h (links) und 96 h (rechts) Wachstum in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Transkription des *ace1*-Gens wurde nach unterschiedlich langem Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle untersucht. Die Transkription des *ace1*-Gens konnte zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Transkription des *ace1*-Gens nach unterschiedlich langem Wachstum von *F. graminearum* in Minimalmedium mit Cellulose Typ 20 als Kohlenstoffquelle (über RT-PCRs nachgewiesen).

6 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
+	+	+	+	+	+	+

Cellulose Typ 20 ist als reine Cellulose kein naturnahes System. Daher wurde untersucht, ob das *ace1*-Gen auch bei Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand transkribiert wird. Eine Transkription des *ace1*-Gens konnte bei

Ergebnisse

Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand sowohl nach 48 als auch nach 96 h nachgewiesen werden (Abb. 3.19).

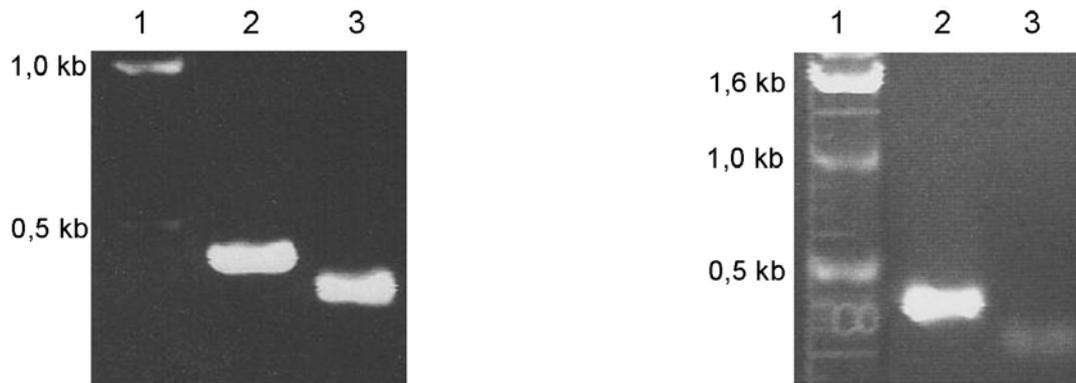


Abb. 3.19: PCRs mit genomischer DNA oder cDNAs von *F. graminearum* als Template (Primer ace1uni2 und ace1rev2, s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 400 bp (Fragmentgröße 390 bp). Die Spuren 3 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit cDNAs als Template bei ca. 300 bp (Fragmentgröße 276 bp). Die in den Spuren 3 eingesetzten cDNAs wurden aus Mycel nach 48 h (links) und 96 h (rechts) Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Eine Transkription des *ace1*-Gens konnte auch nach 48 und 96 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Sorbitol oder Xylan nachgewiesen werden (Tab. 3.5).

Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Infizierung von Weizenpflanzen durch *F. graminearum* spielt, wurde in infizierten Weizenähren nach Transkripten des *ace1*-Gens gesucht. Es konnten bei infizierten Ähren 14 d nach Inokulation (p.i.) Transkripte des *ace1*-Gens gefunden werden (Abb. 3.20).

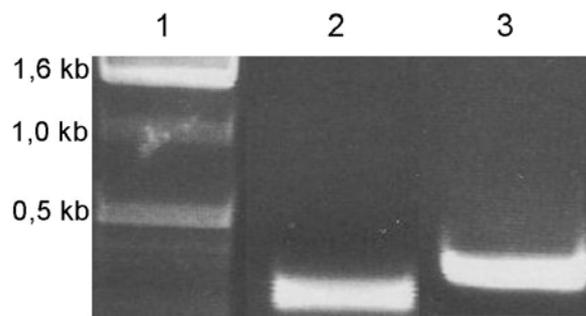


Abb. 3.20: PCRs mit genomischer DNA von *F. graminearum* oder cDNA infizierter Weizenähren (14 d p.i.) als Template (Primer ace1uni2 und ace1rev2, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 3 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit genomischer DNA als Template bei ca. 400 bp (Fragmentgröße 390 bp). Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit cDNA als Template bei ca. 300 bp (Fragmentgröße 276 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Tabelle 3.5 fasst die gewonnenen Ergebnisse nochmals zusammen. Das *ace1*-Gen wurde unter allen untersuchten Bedingungen *in vitro* und *in planta* transkribiert.

Tab. 3.5: Transkription des *ace1*-Gens *in planta* (infizierte Weizenähren) und nach 48 und 96 h Wachstum von *F. graminearum* in Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (über RT-PCRs nachgewiesen). ZW = Weizenzellwand.

Kohlenstoffquelle	48 h	96 h
Glucose	+	+
Sorbitol	+	+
Xylan	+	+
Cellulose	+	+
ZW	+	+
<i>in planta</i>		+

3.2.3 Proteinsequenz des Transkriptionsfaktors ACEI

Die kodierende Sequenz des *aceI*-Gens (Kapitel 3.2.1) lässt sich in ein Protein von 741 Aminosäuren (ACEI) übersetzen (Abb. 3.21).

```
MSFSHPRRRTPVTRPDCDENALSFKNSSTLRKGATFHSPTSPSLTSDIAFVPPPTLP
RAQSHLDDVVDANRRRVALTLNDIDEALAKTQELSLSSSTSKPMTLRDTGLPIPRGFL
EGPIVDPKMTKEEERRTLRPRGRTSRALEDHSDSGLGTSVASTNEKRGAVTASKEAK
VQTRCLTRSAAAAAATGKLPSLGSKAFSRIHEHTLRPLLAKPTLKEFKPIVLDIPRR
IQSKEIICLRDLEKTLIFMAPEKAKSATLYLDFCLTSVRCIQATVEYLSDREQIRPA
DRPYTNGYFLDLKDQILEYGKQLAAKNSGDEMDIDASDEIKLVGGLSVNGRPAELVR
VRKDGTYSISLDTGKPVETDDDAPMKMKRSLSQOLEDEEEIQRSMARRKKNASPEELA
PKKCREPGCNKEFKRPCDLTKHEKTHSRPWKCPVSTCKYHTYGWPTEKEMDRHHNDK
HSAAPAMYECSFKPCPYKSKRESNCKQHMEKAHGWTYVVRTKTNGKKLPSIAGSVQQQ
TPPLGNMSTPSSIEYNSVPTPPQNDVTQFVGNDFPLYPTSDWMSVNNIPAEAMNID
LTLLDSTSPASASSYEQYAPYQNGSDFILDNEDLYAAHMQLPAHFPSPEQAVMYSNPK
MMQQQLPMYQQVPQQIPQPIPVQTAPSQFSPTGQETAMLFTPNSLRDVDEGFDDSFG
ADGMDFPLFPGGNGMAKTNNYQPLFGEIPSANVGFSQNSQDPFQMMDWSSGGFLANL
```

Abb. 3.21: Proteinsequenz (741 Aminosäuren) des Transkriptionsfaktors ACEI. Die grau hinterlegten Aminosäuren (Cystein, C und Histidin, H) koordinieren das Zinkion in den Zink-Finger Domänen (unterstrichen). Das Kernlokalisierungssignal ist hervorgehoben.

Die Identität der Proteinsequenzen des ACEI-Faktors aus *F. graminearum* und *T. reesei* beträgt 65 % (GenBank Q9P8W3, Abb. 3.22), die Identität des ACEI-Faktors aus *F. graminearum* zu einem hypothetischen Protein aus *Neurospora crassa* (GenBank XP_332025) beträgt 47 %.

Ergebnisse

```
gra MSFSHPRRRTPVTRPDCDENALSFKNSSTLRKGATFHSPSTSPSLTSDI-AFVPPTLPRA 59
tri MSFSNPRRRTPVTRPGTDCEHGLSLKTTMTLRKGATFHSPSTSPSASSAAGDFVPPTLTRS 60
**** ***** * * * * ***** * ***** *

gra QSHLDDVVDANRRRVALTLNDIDEALAKTQELSLSSTS-KPMTLRDTGLPIPRGFLEGPI 118
tri QSAFDDVVDASRRRIAMTLNDIDEALSK---ASLSDKSPRPKPLRDTSLPVRGFLPEPPV 117
** ***** * * * * ***** * * * * * * * * * * * *

gra VDPKMTKEE-ERRTLRPRGRTSRALEDHSDSGLGTSVASTNEKRGAVTASKEAKVQTRCL 177
tri VDPAMNKQEPERRVLRPRS-VRRTRNHASDSGIGSSVVSTNDKAGAADSTKKP--QASAL 174
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gra TRSAAAAAATGKLPSLGSKAFSRIHEHTLRPLLAKPTLKEFKPIVLDIPRRIQSKEIICL 237
tri TR-SAASSTAMLPSLSHRAVNRIREHTLRPLLEKPTLKEFEPVLDVPRRIRRSKEIICL 233
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gra RDLEKTLIFMAPEKAKSATLYLDFCLTSVRCIQATVEYLSDREQIRPADRPYTNGYFLDL 297
tri RDLEKTLIFMAPEKAKSAALYLDFCLTSVRCIQATVEYLTDREQVRPGDRPYTNGYFIDL 293
***** ***** ***** * * * * ***** **

gra KDQILEYGKQLAAKNS---GDEMDIDASDEIKLVGGLSVNGRPAELVRVRKDGTYISLD 353
tri KEQIYQYGKQLAAIKEKGLADDMDIDPSDEVRLYGGVAENGRPAELIRVKKDGTAYSMA 353
* * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gra TGKPVETDDDAPMKMKRSLSQQLEDEEEIQRSMARRKKNASPEELAPKKCREPGCNKEFK 413
tri TGKIVDMT-ESPTPLKRSLSEQREDEEIMRSMARRKKNATPEDVAPKKCREPGCTKEFK 412
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
↓-----↓-----↓
gra RPCDLTKHEKTHSRPWKCPVSTCKYHTYGWPTTEKEMDRHHNDKHSAPAMYECSEFKPCPY 473
tri RPCDLTKHEKTHSRPWKCIPTCKYHEYGWPTTEKEMDRHINDKHSAPAMYELCFKPCPY 472
***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
-----↓-----↓
gra KSKRESNCKQHMEKAHGWTYVRTKTNGKKLPSIAGSVQQQTPPLGNMSTPSSIIEYNSVPT 533
tri KSKRESNCKQHMEKAHGWTYVRTKTNGKAPSQNGSTAQQTPPLANVSTPSSTPSYSVPT 532
***** ***** ***** * * * * ***** * * * * * * * * * *

gra PPQNDVTQFVGNDFFLYPTDSDWMSVNNIPAEAMN-IDLTLTLDSTSPASASS-YEQYAPYQ 591
tri PPQD---QVMSTDFPMYPADDDWLATYGAQPNTIDAMDGLLENLSPASAASSYEQYPPYQ 589
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gra NGSDFILDNEDLYAAHMQLPAHFPSPEQAVMYSNPKMMQQQLPMYQQVPPQIPQIPVQT 651
tri NGSTFIINDEDIYAAHVQIPAQLPTPEQVYT----KMPQQMPVYH-VQQEPCCTVPILG 644
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gra APSQFSPTGQETAMLFTPNSLRDVDEGFDDSFADGMDPFLFPGNGMAKTNNYQPLFGE 711
tri EP-QFSPNAQQNAVLYTPTSLREVDEGFDES YAADGADFQLFP--ATVDKTDVDFQSLFTD 701
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gra IPSANVGFSQNSQ-DPFQMMDWSSGGFLANL- 741
tri MPSANLGFSTTQPDIFNQIDWSNLDYQGFQE 733
**** ***** * * * * *****
```

Abb. 3.22: Sequenzalignment der Proteinsequenzen der ACEI-Faktoren aus *F. graminearum* (gra) und *T. reesei* (tri). Bereiche erhöhter Identität sind grau, das Kernlokalisierungssignal ist schwarz hinterlegt. Die das Zinkion koordinierenden Aminosäuren sind mit einem Pfeil gekennzeichnet, die Linien zwischen den Pfeilen zeigen die Ausdehnung der Zink-Finger Domänen an. Identische Aminosäuren sind mit einem * markiert.

Ergebnisse

Die Identität der Proteinsequenzen ist ungleich über die Gesamtsequenzen verteilt. Es zeichnen sich zwei Bereiche durch eine erhöhte Identität aus (Box 1 mit einer Identität von 88 % und Box 2 mit einer Identität von 87 %), die durch Bereiche geringerer Identität verbunden sind (Bereich Startcodon bis Box 1 mit einer Identität von 60 %, zwischen den Boxen mit einer Identität von 52 % und Box 2 bis Stopcodon mit einer Identität von 50 %, Abb. 3.22 und 3.23). Die zwei Boxen erhöhter Identität finden sich auch im Vergleich der Proteinsequenzen des ACEI-Faktors aus *F. graminearum* und des hypothetischen Proteins von *N. crassa* (GenBank XP_332025) wieder (nicht gezeigt).

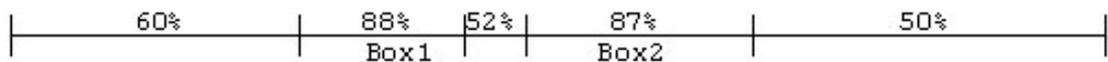


Abb. 3.23: Verteilung der Identität der Proteinsequenzen der ACEI-Faktoren aus *F. graminearum* und *T. reesei*.

Der ersten Box kann keine Funktion aufgrund der Proteinsequenz zugewiesen werden. Sie wird in *F. graminearum* aus den Aminosäuren 200-310 (in Abb. 3.22 grau hinterlegt) gebildet.

Die zweite Box beinhaltet das Kernlokalisierungssignal und das DNA-Bindemotiv der drei Zink-Finger Domänen (in *F. graminearum* Aminosäuren 389-525, in Abb. 3.22 grau hinterlegt). Das Kernlokalisierungssignal (in *F. graminearum* Aminosäuren 389-405, in Abb. 3.22 schwarz hinterlegt), bei dem es sich um ein „bipartite signal“ handelt, zeichnet sich durch folgende Konsensussequenz aus: zwei basische Aminosäuren, gefolgt von zehn beliebigen, gefolgt von einem Bereich, in dem drei von fünf Aminosäuren basisch sind [Dingwall und Laskey, 1991]. Die Sequenz aus *F. graminearum* lautet **RKKNASPEELAPKKCRE** und entspricht damit der Konsensussequenz.

Aufgrund der Konsensussequenz für Zink-Finger ($Cx_{2-4}Cx_{12}Hx_{2-6}H$ [Iuchi, 2001]) lassen sich drei Zink-Finger Domänen in der Proteinsequenz des ACEI-Faktors aus

F. graminearum finden (Abb. 3.22 und Abb. 3.21). Die erste (Aminosäuren 403-425) und die dritte (Aminosäuren 466-489) Zink-Finger Domäne entsprechen der Konsensussequenz vollständig, die zweite Zink-Finger Domäne (Aminosäuren 431-457) ist zwischen dem letzten Cystein und dem ersten Histidin sowohl in *F. graminearum* als auch in *T. reesei* um drei Aminosäuren verlängert (Cx₁₅H).

3.2.4 Alternatives Spleißen der mRNA des *ace1*-Gens

Die nicht gespleißte Nukleotidsequenz der *ace1*-mRNA lässt sich in eine Proteinsequenz übersetzen. Die Introns zwei und drei des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* (Abb. 3.16) haben kein Stopcodon im Leseraster +1 und würden bei einer Translation keinen Leserasterwechsel verursachen (Abb. 3.24). Das translatierte Protein einer nicht gespleißten mRNA des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* wäre um 38 Aminosäuren verlängert (Abb. 3.24).

```
spl+ IFMAP-----EKAKSATLYLDFCLTSVRCIQATVEYLSDREQIR 39
spl- IFMAPVSQLLTNGVWENTYRTLSLKEKAKSATLYLDFCLTSVRCIQATVEYLSDREQIR 60
      *****
spl+ PADRPYTINGYFLDLKDQILEYGKQLAAKNSGDEMDIDA-----SDEIK 82
spl- PADRPYTINGYFLDLKDQILEYGKQLAAKNSGDEMDIDAYVPSFVPLNHPTNLPQRSDEIK 120
      *****
```

Abb. 3.24: Aminosäurealignment eines Ausschnittes des ACEI-Faktors aus *F. graminearum*. Die mit spl+ gekennzeichnete Sequenz wurde aus der gespleißten, die mit spl- gekennzeichnete Sequenz wurde aus der nicht gespleißten Nukleotidsequenz übersetzt. Die aus den Introns zwei (21 Aminosäuren) und drei (17 Aminosäuren) abgeleiteten Proteinsequenzen sind grau hinterlegt.

Dasselbe Ergebnis ergab eine Übersetzung der Nukleotidsequenz des *ace1*-Gens aus *T. reesei* (Abb. 3.25) und des Gens des hypothetischen Proteins aus *N. crassa* (nicht gezeigt). Auch hier konnten die Introns in eine Proteinsequenz übersetzt werden, ohne einen Leserasterwechsel zu verursachen.

Ergebnisse

```
spl+ DLEKTLIFMAP-----EKAKSAALYLDFCLTSVRCIQATVEYLT 39
spl- DLEKTLIFMAPVSRLLTDDGVWGDAYRMLRQEKAKSAALYLDFCLTSVRCIQATVEYLT 60
      *****
      *****

spl+ DREQVRPGDRPYTNGYFIDLKEQIYQYGKLAAIKEKGSLADDMDIDP----- 87
spl- DREQVRPGDRPYTNGYFIDLKEQIYQYGKLAAIKEKGSLADDMDIDPYVLPCLIPLVDV 120
      *****
      *****

spl+ -----SDEVRLYGG 96
spl- ETTPTNAPSRSDEVRLYGG 139
      *****
```

Abb. 3.25: Aminosäurealignment eines Ausschnittes des ACEI-Faktors aus *T. reesei*. Die mit spl+ gekennzeichnete Sequenz wurde aus der gespleißten, die mit spl- gekennzeichnete Sequenz wurde aus der nicht gespleißten Nukleotidsequenz übersetzt. Die aus den Introns zwei (21 Aminosäuren) und drei (22 Aminosäuren) abgeleiteten Proteinsequenzen sind grau hinterlegt.

Um zu untersuchen, ob sich tatsächlich nicht gespleißte mRNA des *ace1*-Gens finden lässt, wurden RT-PCRs mit Primern durchgeführt, die innerhalb der Introns zwei und drei sowie direkt vor und direkt nach den Intronsequenzen binden (*ace1uni2* und *ace1rev3* sowie *ace1uni3* und *ace1rev2*, Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1 und Abb. 3.26).

```
TCTTGAGAAAACCTGATCTTTATGGCACCace1uni2GGTAAGTCAGCTTCTGACTAATAATGGC
GTTTGGGAAAATACTTATCGGACace1uni3TTTGTCTTTAAAGGAGAAGGCTAAATCAGCAACCT
TGTACCTGGATTTCTGCCTTACATCCGTCCGATGCATTace1uni2CAGGCGACAGTCGAATATCTTAGC
GACCGGAACAAATTCGACCCGCAGACCGGCCTTACACTAACGGATACTTCCTCGACCTTAA
GGATCAGATTTTAGAATACGGAAAACAace1rev3ACTTGCCGCCAAGAACAGCGGCGACGAAATGGATA
TCGACGCGTATGTACCCAGCTTace1rev3CGTTCCCTTGAACCACCAACTAACTTGCCACAAAG
ace1rev2ATCTGATGAGATCAAGCTCGTCGGTGGCCT
```

Abb. 3.26: Bereich des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* mit den Sequenzen der Introns zwei und drei (grau hinterlegt). Die unterstrichenen Sequenzbereiche geben die Primerbindestellen an.

Die Primerkombination *ace1uni2* und *ace1rev3* amplifizierte mit cDNA als Template zwei Fragmente von ca. 350 (Fragmentgröße 354 bp) und 300 bp (Fragmentgröße 291 bp) Länge (Abb. 3.27 Spur 3 links). Das größere Fragment entspricht der Größe des Amplikons der genomischen DNA (Abb. 3.27 Spur 2 links). Das kleinere Fragment ist etwa 50 bp kleiner, was der Länge der Sequenz des zweiten Introns (63

Ergebnisse

bp) entspricht. Die Sequenzierung des kleineren Fragments bestätigte das Fehlen des zweiten Introns, während das dritte Intron vorhanden war.

Die Primerkombination ace1uni3 und ace1rev2 amplifizierte mit cDNA als Template ebenfalls zwei Fragmente von ca. 350 (Fragmentgröße 339 bp) und 300 bp (Fragmentgröße 288 bp) Länge (Abb. 3.27 Spur 3 rechts). Das größere Fragment entspricht der Größe des Amplikons der genomischen DNA (Abb. 3.27 Spur 2 rechts). Das kleinere Fragment ist etwa 50 bp kleiner, was der Länge der Sequenz des dritten Introns (51 bp) entspricht. Die Sequenzierung des kleineren Fragments bestätigte das Fehlen des dritten Introns, während das zweite Intron vorhanden war.

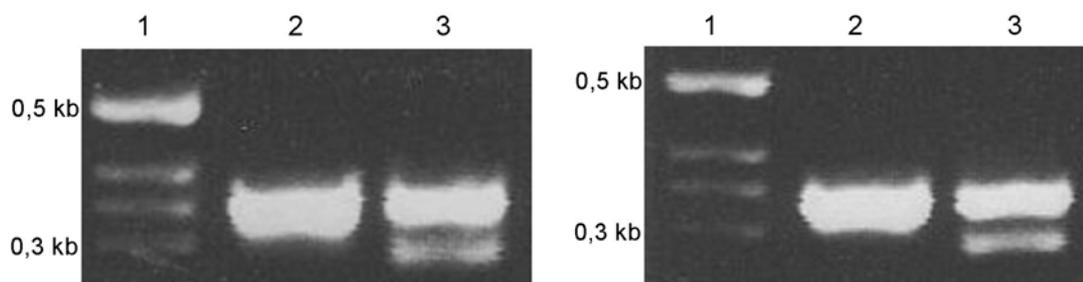


Abb. 3.27: PCRs mit genomischer DNA oder cDNA von *F. graminearum* als Template (Primer ace1uni2 und ace1rev3 (links) und ace1uni3 und ace1rev2 (rechts), Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA als Template bei ca. 350 bp (Fragmentgrößen 354 bp links und 339 bp rechts). Die Spuren 3 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit cDNA als Template bei ca. 350 (Fragmentgrößen 354 bp links und 339 bp rechts) und ca. 300 bp (Fragmentgrößen 291 bp links und 288 bp rechts). Die in den Spuren 3 eingesetzte cDNA wurde aus Mycel nach 48 h Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle gewonnen. Zur Größenbestimmung wurde in die Spuren 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die potentiellen Proteinsequenzen der zweiten Introns der beiden *ace1*-Gene aus *F. graminearum* und *T. reesei* sowie des ersten Introns des Gens des hypothetischen Proteins aus *N. crassa* zeigt Abbildung 3.28. Die Proteinsequenzen haben mit 21 Aminosäuren in allen drei Fällen die selbe Länge. Es gibt sieben konservierte Aminosäuren (Valin (V), Serin (S), Tyrosin (Y), Arginin (R), Leucin (L) und Lysin (K), in Abb. 3.28 mit einem * markiert). Alle drei Proteinsequenzen enthalten

Ergebnisse

mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen. Die Sequenz aus *F. graminearum* weist drei potentielle Phosphorylierungsstellen auf, und zwar an Position 14 (Threonin (T), Wahrscheinlichkeit 90 %), an Position 15 (Tyrosin (Y), Wahrscheinlichkeit 54 %) und an Position 19 (Serin (S), Wahrscheinlichkeit 99 %). In der Sequenz aus *T. reesei* lassen sich zwei potentielle Phosphorylierungsstellen finden, und zwar an Position sechs (Threonin (T), Wahrscheinlichkeit 70 %) und an Position 15 (Tyrosin (Y), Wahrscheinlichkeit 28 %). Die Sequenz aus *N. crassa* weist drei potentielle Phosphorylierungsstellen auf, und zwar an der Position 14 (Threonin (T), Wahrscheinlichkeit 96 %), an der Position 15 (Tyrosin (Y), Wahrscheinlichkeit 17 %) und an der Position 20 (Serin (S), Wahrscheinlichkeit 84 %). Die Phosphorylierungsstellen wurden mit NetPhos 2.0 vorhergesagt.

```
gra2  VSQLLTNNGVWENTYR*TL*SLK 21
tri2  VSRLLTDDGVWGDAYRMLRQK 21
neu1  VSEFKDPLDVRMNTYR*ALL*SK 21
      **          *      ** * *
```

Abb. 3.28: Aminosäurealignment der in Proteinsequenzen übersetzten Introns aus *F. graminearum* (gra2), *T. reesei* (tri2) und *N. crassa* (neu1). Konservierte Aminosäuren sind mit einem * markiert, potentielle Phosphorylierungsstellen sind grau hinterlegt.

Die potentiellen Proteinsequenzen der dritten Introns der beiden *ace1*-Gene aus *F. graminearum* und *T. reesei* sowie des zweiten Introns des Gens des hypothetischen Proteins aus *N. crassa* zeigt Abb. 3.29. Die Längen der übersetzten Sequenzen sind mit 17 Aminosäuren (*F. graminearum*), 18 Aminosäuren (*N. crassa*) und 22 Aminosäuren (*T. reesei*) variabler als die Längen der übersetzten Sequenzen der zweiten Introns. Außer einem Tyrosin (Y) an Position eins (in Abb. 3.29 mit einem * markiert) sind keine Aminosäuren konserviert. Bei allen Sequenzen ist das konservierte Tyrosin eine potentielle Phosphorylierungsstelle (Wahrscheinlichkeit in *F. graminearum* 32 %, *T. reesei* 73 % und *N. crassa* 31 %). Die Sequenz aus *F. graminearum* weist keine weiteren potentiellen Phosphorylierungsstellen (Wahrscheinlichkeit >10 %) auf. Die Sequenz aus *T. reesei* enthält zwei weitere potentielle Phosphorylierungsstellen (Serin (S), Wahrscheinlichkeit 99 % und Threonin (T), Wahrscheinlichkeit 96 %). Die Sequenz aus *N. crassa* weist ebenfalls

Ergebnisse

zwei weitere potentielle Phosphorylierungsstellen auf (Tyrosin (Y), Wahrscheinlichkeit 86 % und Serin (S), Wahrscheinlichkeit 12 %). Die Phosphorylierungsstellen wurden mit NetPhos 2.0 vorhergesagt.

```
gra3  YV-PSFVPLN----HPTNLPQR 17
tri3  YVLPCLIPLDVETIPTNAPSR 22
neu2  YD--SLFSCN--CAACADVYFS 18
      *
```

Abb. 3.29: Aminosäurealignment der in Proteinsequenzen übersetzten Introns aus *F. graminearum* (gra3), *T. reesei* (tri3) und *N. crassa* (neu2). Konservierte Aminosäuren sind mit einem * markiert, potentielle Phosphorylierungsstellen sind grau hinterlegt.

Alle übersetzten Intronsequenzen weisen zudem potentielle Glykosylierungsstellen auf, die allerdings nicht konserviert sind.

3.2.5 „Knock-out“ des *ace1*-Gens in *F. graminearum*

3.2.5.1 Vektorkonstruktion

Die Grundlage für den „knock-out“ Vektor bildete der Vektor pCB1003. In diesen Vektor wurde ein 592 bp langes Fragment des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* kloniert, so dass über homologe Rekombination eine Integration des Vektors in das *ace1*-Gen von *F. graminearum* möglich wurde. Der „knock-out“ Vektor (KO1) hat eine Größe von 4662 bp (Kapitel 2.2.3).

Die Klonierung des KO1 Vektors wurde mit Hilfe von PCRs überprüft (Abb. 3.30). Mit den vektorspezifischen Primern M13uni und M13rev wurde der Vektorbereich mit der Hygromycinkassette (1414 bp) und der „left border“ (592 bp) amplifiziert (Kapitel 2.2.3). Die Bande des Amplikons in Abb. 3.30 (Spur 3) hat mit ca. 2 kb die zu erwartende Größe von 2111 bp (Hygromycinkassette 1414 bp plus LB 592 bp

plus Vektorsequenz 105 bp, Abb. 2.3). Das Vorhandensein der „left border“ im KO1 Vektor wurde über PCRs mit vektorspezifischen (M13uni / M13rev) und „left border“ spezifischen Primern (ace1uni4 / ace1rev4, s. Anhang Tab. A.1) überprüft (Abb. 3.30 Spuren 2 und 4). Die Größe der Amplikons von ca. 1800 bp (M13uni und ace1rev4, Spur 2 in Abb. 3.30) und 300 bp (M13rev und ace1uni4, Spur 4 in Abb. 3.30) entsprechen den errechneten Fragmentgrößen von 1863 und 278 bp. Ebenfalls überprüft wurde, ob sich das Gen der Hygromycinphosphotransferase (Hpt) im Vektor befindet. Dazu wurde eine PCR mit Hpt-spezifischen Primern (hygrouni und hygrovrev, s. Anhang Tab. A.1) durchgeführt. Die PCR amplifizierte ein Fragment von ca. 1000 bp Länge, was der zu erwartenden Fragmentgröße von 1026 bp entspricht (Abb. 3.30 Spur 5). Sowohl die „left border“ als auch die Hygromycinkassette sind im Vektor KO1 enthalten.

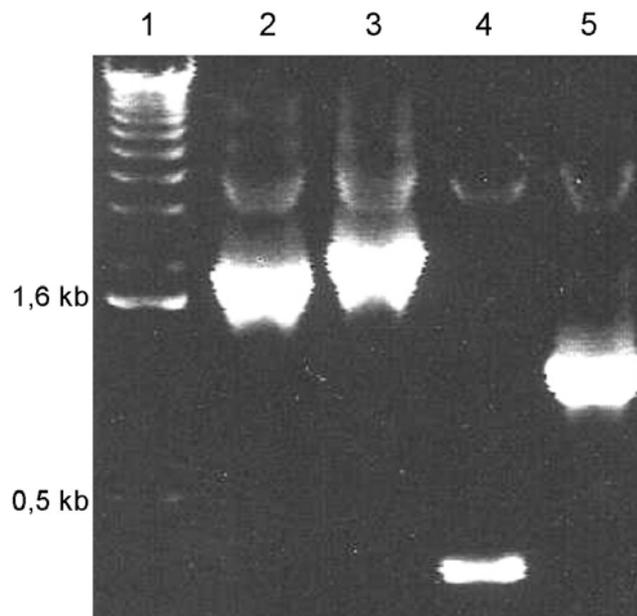


Abb. 3.30: PCRs mit DNA des KO1 Vektors als Template. Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit den Primern M13uni und ace1rev4 bei ca. 1800 bp (Fragmentgröße 1863 bp). Die Spur 3 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit den Primern M13uni und M13rev bei ca. 2000 bp (Fragmentgröße 2111 bp). Die Spur 4 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit den Primern M13rev und ace1uni4 bei ca. 300 bp (Fragmentgröße 278 bp). Die Spur 5 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit den Primern hygrouni und hygrovrev bei ca. 1000 bp (Fragmentgröße 1026 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

3.2.5.2 Transformation von *F. graminearum*

Die Transformation von *F. graminearum* wurde wie im Material und Methodenteil (Kapitel 2.2.2) beschrieben durchgeführt. Die mit dem Vektor KO1 (Kapitel 2.2.3) oder Wasser (Kontrolle) transformierten Protoplasten wurden auf Hygromycin B haltigen CM-Platten ausgestrichen und bei 28 °C inkubiert (Kapitel 2.1.1). Nach fünf Tagen waren zwei Kolonien auf den selektiven Platten angewachsen, während auf den Kontrollplatten kein Wachstum zu erkennen war. Die gewachsenen Kolonien wurden in Sporulationsmedium (Kapitel 2.1.4) umgesetzt. Die gebildeten Sporen beider Transformanten wurden nach acht Tagen auf Hygromycin B haltigen Platten zur Isolation von Einzelsporenkolonien ausgestrichen (Kapitel 2.2.2). Nach sechs Tagen Wachstum wurden einzelne Kolonien beider Transformanten in flüssiges, selektives CM zur Vermehrung der Mycelmasse umgesetzt. Jeweils ein Ansatz beider Transformanten wurde mit Hilfe von PCRs auf die Integration des Vektors KO1 in das *ace1*-Gen untersucht (Abb. 3.31).

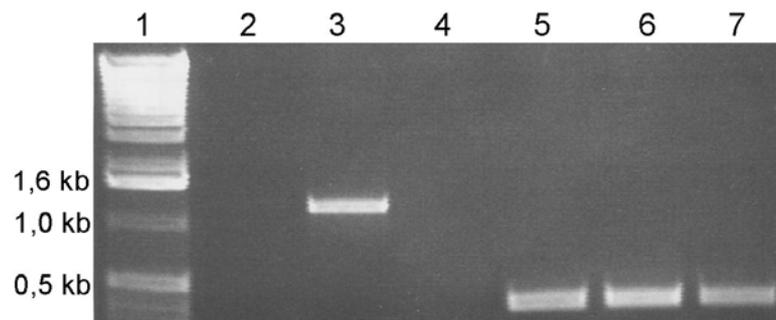


Abb. 3.31: PCRs mit genomischer DNA von *F. graminearum* Wildtyp, Transformant 1 oder Transformant 2 als Template (Spuren zwei bis vier Primer M13rev und ace1uni5, Spuren 5 bis 7 Primer ace1uni2 und ace1rev2, Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Die Spuren 2 (PCR mit genomischer DNA des Wildtyps als Template) und 4 (PCR mit genomischer DNA des Transformanten 2 als Template) zeigen keine Banden. Die Spur 3 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit genomischer DNA des Transformanten 1 als Template bei ca. 1200 bp (Fragmentgröße 1174 bp). Die Spuren 5 bis 7 zeigen die Banden der Amplikons der PCRs mit genomischer DNA des Wildtyps (Spur 5), des Transformanten 1 (Spur 6) oder des Transformanten 2 (Spur 7) bei ca. 400 bp (Fragmentgröße 390 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Ergebnisse

Die Spuren zwei bis vier zeigen das Ergebnis einer PCR mit genomischer DNA des Wildtyps (Spur 2) und der beiden Transformanten (Spuren 3 und 4) von *F. graminearum* (Primer M13rev und ace1uni5, s. Anhang Tab. A.1). Der Primer ace1uni5 bindet 5' von der potentiellen Integrationsstelle des KO1 Vektors im *ace1*-Gen, während der Primer M13rev in der Vektorsequenz des KO1 Vektors bindet. Diese Primerkonstellation kann nur im Fall einer Integration des KO1 Vektors in das *ace1*-Gen zu einem positiven Ergebnis führen (Fragmentgröße 1174 bp). Der Wildtyp enthält keine Vektorsequenz, so dass das Fehlen einer Bande in Abb. 3.31 (Spur 2) zu erwarten war. Bei der PCR mit genomischer DNA der beiden Transformanten (Spuren 3 und 4) konnte nur bei dem ersten Transformanten (Spur 3) ein Amplikon von ca. 1200 bp Größe amplifiziert werden. Die Integration des KO1 Vektors war nur bei diesem Transformanten erfolgreich. Alle weiteren Versuche wurden mit diesem Transformanten durchgeführt, der im Folgenden $\Delta ace1$ genannt wird.

In den Spuren 5 bis 7 wurden zwei Primer (ace1uni2 und ace1rev2, s. Anhang Tab. A.1) verwendet, die beide 3' von der potentiellen Integrationsstelle des KO1 Vektors im *ace1*-Gen binden. Dieser Bereich wird von der Integration des KO1 Vektors nicht betroffen und sollte bei PCRs mit DNA des Wildtyps und der beiden Transformanten zu einem positiven Ergebnis führen. Sowohl bei der Verwendung von DNA des Wildtyps (Spur 5) als auch von DNA der beiden Transformanten (Spuren 6 und 7) konnte die Bande eines Amplikons von ca. 400 bp Größe amplifiziert werden (Fragmentgröße 390 bp).

Bei der Vektorintegration über homologe Rekombination kommt es regelmäßig zu einer Verdoppelung der homologen Sequenz. Es wurde daher über PCRs untersucht, ob es bei der Vektorintegration zu einer Verdoppelung der „left border“ gekommen ist (Abb. 3.32 und 3.34). Mit dem Primerpaar ace1uni4 (bindet in der „left border“) und ace1rev2 (bindet 3' von der Integrationsstelle des KO1 Vektors) wurde überprüft, ob die Sequenz der „left border“ am 3' Ende der Integrationsstelle vorhanden ist (Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Die Bande des Amplikons bei ca. 750 bp (Fragmentgröße 758 bp) belegt das Vorhandensein der „left border“ am 3' Ende der Integrationsstelle (Abb. 3.32 Spur 2). Mit dem Primerpaar ace1uni5 (bindet 5' von der Integrationsstelle des KO1 Vektors) und ace1rev4 (bindet in der „left

Ergebnisse

border“) wurde überprüft, ob die Sequenz der „left border“ am 5` Ende der Integrationsstelle vorhanden ist (Primersequenzen s. Anhang Tab. A.1). Die Bande des Amplikons bei ca. 1000 bp (Fragmentgröße 920 bp) belegt das Vorhandensein der „left border“ am 5` Ende der Integrationsstelle (Abb. 3.32 Spur 3). Die Sequenz der „left border“ hat sich durch die Integration des Vektors KO1 ins Genom von *F. graminearum* verdoppelt (Abb. 3.34).

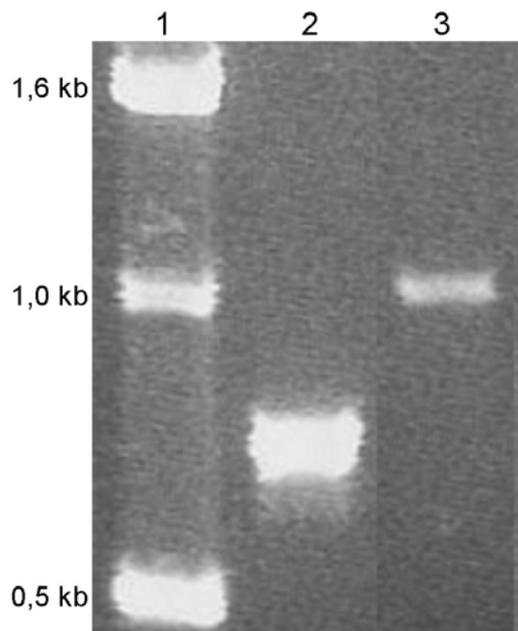


Abb. 3.32: PCRs mit genomischer DNA von *F. graminearum* $\Delta ace1$. Die Spur 2 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit den Primern ace1uni4 und ace1rev2 (s. Anhang Tab. A.1) bei ca. 750 bp (Fragmentgröße 758 bp). Die Spur 3 zeigt die Bande des Amplikons der PCR mit den Primern ace1uni5 und ace1rev4 (s. Anhang Tab. A.1) bei ca. 1000 bp (Fragmentgröße 920 bp). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Bildung des Transkriptionsfaktors ACEI kann nur verhindert werden, wenn kein intaktes *aceI*-Gen mehr im Genom vorhanden ist. Um zu überprüfen, ob es nicht transformierte *aceI*-Kopien im Genom von *F. graminearum* $\Delta ace1$ gibt, wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die vor und hinter der Integrationsstelle des KO1 Vektors binden (Primer ace1uni5 und ace1rev2, s. Anhang Tab. A.1). Lediglich bei *aceI*-Genen ohne Integration kann aufgrund der Größe des integrierten Vektors (4662 bp, vgl. Kapitel 2.2.3) mit der Bande eines Amplikons bei ca. 1600 bp

Ergebnisse

gerechnet werden (Abb. 3.33). Das Ergebnis der PCR mit genomischer DNA von *F. graminearum* $\Delta ace1$ ist in Spur 1 (Abb. 3.33) gezeigt. Das Fehlen einer Bande beweist, dass es keine nicht transformierten *ace1*-Gene im Genom von *F. graminearum* $\Delta ace1$ gibt. Die Verwendung der gleichen Primer in einer PCR mit genomischer DNA des Wildtyps von *F. graminearum* erzeugt die Bande eines Amplikons von ca. 1600 bp Größe (die Primer amplifizieren ein Fragment von 1648 bp aus dem intakten *ace1*-Gen).

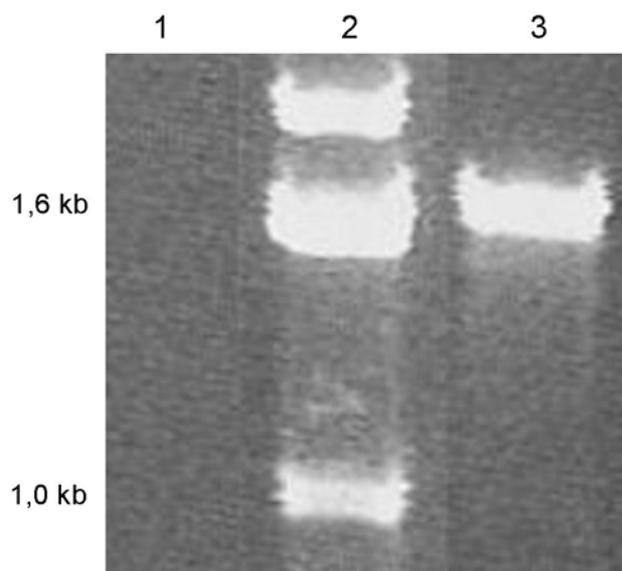


Abb. 3.33: PCRs mit genomischer DNA von *F. graminearum* $\Delta ace1$ oder Wildtyp als Template (Primer *ace1uni5* und *ace1rev2*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 1 zeigt keine Bande (PCR mit genomischer DNA von *F. graminearum* $\Delta ace1$), während die Spur 3 die Bande des Amplikons der PCR mit genomischer DNA von *F. graminearum* Wildtyp bei ca. 1600 bp (Fragmentgröße 1648 bp) zeigt. Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 2 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

Die Integration des KO1 Vektors in das Genom von *F. graminearum* $\Delta ace1$ ist in Abb. 3.34 zusammenfassend dargestellt. Bei der Integration des KO1-Vektors in das *ace1*-Gen kam es zu einer Verdoppelung des homologen Bereichs („left border“). Es gibt keine intakten *ace1*-Gene mehr im Genom von *F. graminearum* $\Delta ace1$.

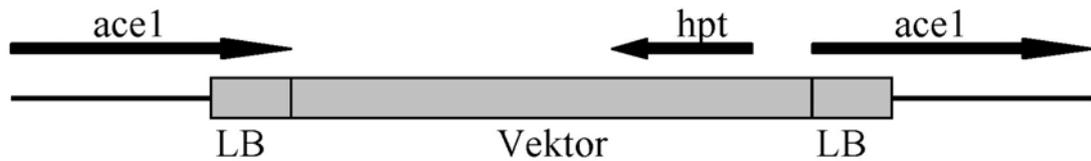


Abb. 3.34: Integration des KO1 Vektors in das Genom von *F. graminearum* $\Delta ace1$. Die Nukleotidsequenz um die Integrationsstelle ist als schwarze Linie dargestellt. Die Sequenzen des Vektors KO1 (Vektor) und der bei der Integration verdoppelten „left border“ (LB) sind als graue Boxen dargestellt. Die Pfeile zeigen die Lage des *ace1*-Gens (*ace1*) und des Gens der Hygromycinphosphotransferase (*hpt*) an.

Um zu untersuchen, ob noch intakte mRNA des *ace1*-Gens gebildet wird, wurde eine RT-PCR mit Primern durchgeführt, die 5' und 3' von der Integrationsstelle des Vektors binden (Primer *ace1uni5* und *ace1rev5*, s. Anhang Tab. A.1). Die Ergebnisse der RT-PCR zeigt Abb. 3.35. Bei der RT-PCR mit mRNA des Wildtyps wurden zwei Fragmente amplifiziert (ca. 1400 und 1000 bp, Spur 2 Abb. 3.35). Während es sich bei dem größeren Fragment vermutlich um eine Verunreinigung mit genomischer DNA handelt (Fragmentgröße 1439 bp), stammt das kleinere Fragment von gespleißter mRNA des *ace1*-Gens (Fragmentgröße 1085 bp). Bei der RT-PCR mit mRNA von *F. graminearum* $\Delta ace1$ traten dagegen keine Banden auf (Spur 3 Abb. 3.35). Die Bildung von intakten mRNAs des *ace1*-Gens in *F. graminearum* $\Delta ace1$ findet nicht mehr statt.

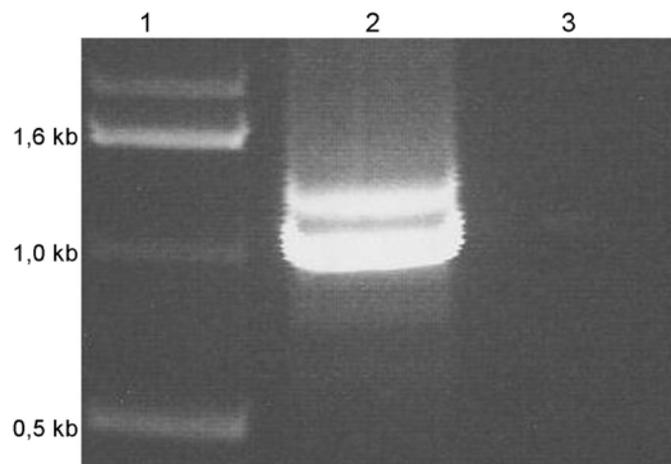


Abb. 3.35: PCRs mit cDNAs von *F. graminearum* $\Delta ace1$ oder Wildtyp als Template (Primer *ace1uni5* und *ace1rev5*, s. Anhang Tab. A.1). Die Spur 2 zeigt die Banden zweier Amplikons der PCR mit cDNA von *F. graminearum* Wildtyp als Template bei ca. 1400 bp (Fragmentgröße 1439 bp) und ca. 1000 bp (Fragmentgröße 1085 bp). Die Spur 3 zeigt keine Bande (PCR mit cDNA von *F. graminearum* $\Delta ace1$ als Template). Zur Größenbestimmung wurde in die Spur 1 die 1-kb-Leiter aufgetragen (Kapitel 2.3.6).

3.2.5.3 Wachstum von *F. graminearum* Wildtyp und $\Delta ace1$ auf Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

In *T. reesei* konnte eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors ACEI an der Regulation von Cellulasen und Xylanasen nachgewiesen werden. Der Vergleich des Wachstums von *F. graminearum* Wildtyp und $\Delta ace1$ auf Minimalmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen sollte Hinweise auf die Rolle des ACEI Faktors in *F. graminearum* geben (Abb. 3.36). Sowohl der Wildtyp als auch die Mutante $\Delta ace1$ wurden neun Tage lang auf je drei Agarplatten mit Glucose, Sorbitol, Cellulose oder Xylan als Kohlenstoffquelle angezogen (Kapitel 2.1.2) und die Durchmesser der Kolonien regelmäßig bestimmt.

Das Wachstum des Wildtyps und der $\Delta ace1$ Mutante unterschied sich beim Wachstum auf Minimalmedien mit Glucose oder Sorbitol als Kohlenstoffquellen kaum voneinander. Während der Wildtyp auf Glucose etwas schneller wuchs als die $\Delta ace1$ Mutante (Koloniedurchmesser (\emptyset) nach neun Tagen: Wildtyp 4,9 cm, $\Delta ace1$ Mutante 3,8 cm, Abb. 3.36 oben links), war es auf Minimalmedium mit Sorbitol umgekehrt (Koloniedurchmesser (\emptyset) nach neun Tagen: Wildtyp 4,9 cm, $\Delta ace1$ Mutante 6,2 cm, Abb. 3.36 oben rechts).

Auf Minimalmedien mit Cellulose oder Xylan als Kohlenstoffquellen unterschied sich das Wachstum des Wildtyps und der $\Delta ace1$ Mutante deutlicher voneinander. Während der ersten vier Tage mit Cellulose als Kohlenstoffquelle wuchsen sowohl der Wildtyp als auch die $\Delta ace1$ Mutante nahezu gleich (Koloniedurchmesser (\emptyset) nach 4 Tagen: Wildtyp 3,1 cm, $\Delta ace1$ Mutante 2,7 cm, Abb. 3.36 unten links). Nach dieser Anfangsphase schwächte sich das Wachstum des Wildtyps deutlich ab, während die Wachstumsgeschwindigkeit der $\Delta ace1$ Mutante zunahm. Nach neun Tagen Wachstum mit Cellulose als Kohlenstoffquelle war der Durchmesser der $\Delta ace1$ Kolonien fast doppelt so groß wie der Durchmesser der Wildtypkolonien (Wildtyp (\emptyset) 4,5 cm, $\Delta ace1$ Mutante (\emptyset) 7,6 cm, Abb. 3.36 unten links). Das Wachstum auf Minimalmedium mit Xylan als Kohlenstoffquelle unterschied sich zwischen dem Wildtyp und der $\Delta ace1$ Mutante in den ersten vier Tagen der

Ergebnisse

Kultivierung ebenfalls kaum voneinander (Koloniedurchmesser (\varnothing) nach 4 Tagen: Wildtyp 4 cm, $\Delta ace1$ Mutante 3,8 cm, Abb. 3.36 unten rechts). Das Wachstum des Wildtyps verlangsamte sich deutlich nach diesen ersten vier Tagen, während die Wachstumsgeschwindigkeit der $\Delta ace1$ Mutante nur geringfügig abnahm. Nach neun Tagen Wachstum unterschieden sich die Kolonien in ihrem Durchmesser deutlich voneinander (Koloniedurchmesser (\varnothing) nach neun Tagen: Wildtyp 5,6 cm, $\Delta ace1$ Mutante 7,5 cm, Abb. 3.36 unten rechts).

Das Wachstum auf den je drei Platten des selben Minimalmediums war insgesamt sehr gleichförmig, größere Abweichungen der Koloniedurchmesser in den drei Parallelansätzen konnten nicht beobachtet werden.

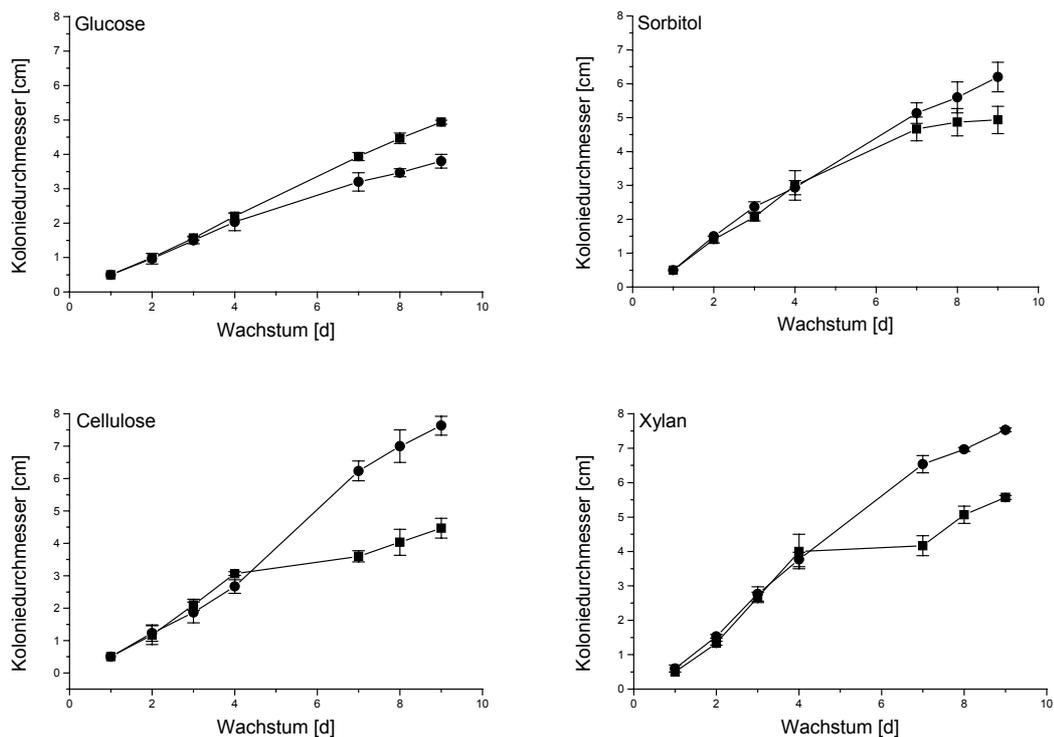


Abb. 3.36: Durchschnittliche Koloniedurchmesser (mit Standardabweichungen) von *F. graminearum* Wildtyp (-■-) und *F. graminearum* $\Delta ace1$ (-●-) auf Agarplatten mit unterschiedlichen Minimalmedien (Glucose, Sorbitol, Cellulose (CT 20) oder Xylan als Kohlenstoffquelle). Den Platten für *F. graminearum* $\Delta ace1$ wurde Hygromycin B (100 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Es wurden jeweils drei Platten gemessen.

3.2.5.4 Infektion von Weizenähren mit *F. graminearum* $\Delta ace1$ und *F. graminearum* Wildtyp

Mit einer Pinzette wurde jeweils ein Ährchen einer Ähre einer blühenden Weizenpflanze der Sorte Bobwhite mit jungem Mycel des Wildtyps oder der $\Delta ace1$ Mutante infiziert. Nach zwei Tagen Inkubation konnten bei den mit der $\Delta ace1$ Mutante infizierten Ähren erste Symptome eines Fusariumbefalls festgestellt werden (Braunfärbung), während die mit dem Wildtyp infizierten Ähren und die Kontrollen keine Symptome aufwiesen (Abb. 3.37, oben). Aufgrund der anscheinend erhöhten Virulenz der $\Delta ace1$ Mutante wurden die Ähren von den Pflanzen getrennt und in sterile Weckgläser überführt (Kapitel 2.1.9). Die ersten Symptome auf den mit dem Wildtyp infizierten Ähren zeigten sich nach vier Tagen. Bis zum Abbruch des Versuches nach 15 Tagen waren die Symptome auf den mit der $\Delta ace1$ Mutante infizierten Ähren wesentlich stärker als auf den mit dem Wildtyp infizierten Ähren (Abb. 3.37, unten). Während die $\Delta ace1$ Mutante einen sehr ausgeprägten Mycelbewuchs auf den Ähren ausbildete („Nikolausbart“), war diese Entwicklung auf den mit dem Wildtyp infizierten Ähren zu jeder Zeit wesentlich schwächer. Die Kontrollen, die mit Wasser behandelt worden waren, zeigten zu keiner Zeit Befallssymptome. Allerdings kam es bei den Kontrollen wie auch bei den infizierten Ähren zu einem Ausbleichen der Ähren, die in den Kontrollen allerdings verspätet einsetzte und wesentlich schwächer ausgeprägt war (Abb. 3.37, unten).

2d



15d

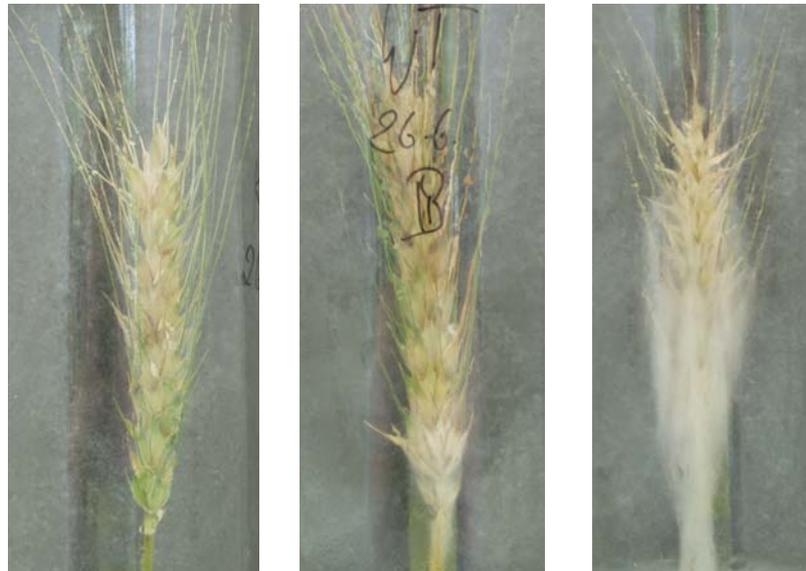


Abb. 3.37: Infektion von Weizenähren mit *F. graminearum* $\Delta ace1$ (rechts), *F. graminearum* Wildtyp (mitte) oder Wasser (Kontrolle, links). Die Fotos nach 2 d wurden unmittelbar nach dem Abschneiden der Ähren von den Pflanzen aufgenommen. Die Ähren wurden bis zum Abbruch des Versuches nach 15 d in sterilen Weckgläsern (Kapitel 2.1.9) weiter inkubiert.

Von den infizierten Ähren wurde Mycelmasse abgenommen und auf CM-Platten ausplattiert. Sowohl der Wildtyp als auch die $\Delta ace1$ Mutante (auf Hygromycin B haltigen Agarplatten) wuchsen wieder an und zeigten den typischen Habitus von *F. graminearum*.

3.3 *Intronalignment*

Introns kommen in zahlreichen eukaryotischen Genen vor. Sie müssen vor der Translation aus der mRNA herausgeschnitten werden, ein Vorgang, der als Spleißen bezeichnet wird. Dazu ist es notwendig, dass Introns bestimmte Erkennungssequenzen besitzen, damit sie von Exons eindeutig unterschieden werden können. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um die beiden Intron – Exon-Grenzen am 5' und am 3' Ende der Introns und um eine interne Verzweigungsstelle. Gurr *et al.* [1987] haben diese konservierten Sequenzbereiche in filamentösen Pilzen zu einer Konsensussequenz zusammengefasst (5'-GTANGT ... YGCTAACN ... YAG-3'). Brown *et al.* [2001] haben eine speziellere Konsensussequenz für das Trichothecen Cluster zweier *Fusarium* Arten aufgestellt (vereinfacht nach Brown: 5'-GTRDGW ... NDYTRABNH ... YNRHAG-3').

Im Verlauf dieser Arbeit wurden elf Introns von *F. graminearum* K59 sequenziert, davon stammen acht aus insgesamt vier Cellulasegenen (vier Introns des *cel6*-Gens, zwei Introns des *cel7A*-Gens, ein Intron des *cel7B*-Gens und ein Intron des *cel45*-Gens, Kapitel 3.1) und drei aus dem Gen für den Transkriptionsfaktor ACEI (Kapitel 3.2). Die Intron Grenzen und die internen Verzweigungsstellen dieser elf Introns wurden auf invariante Nukleotide untersucht. Es wurde eine Konsensussequenz für *F. graminearum* K59 abgeleitet (**GT_{DH}GB ... HRCTNA_{YNN} ... NNNHAG**) und mit den Konsensussequenzen nach Gurr *et al.* [1987] und Brown *et al.* [2001] verglichen (Abb. 3.38).

cel6-1	GTGAGT ... TACTCACAT ... CCATAG
cel6-2	GTGAGT ... TACTAACCA ... CGATAG
cel6-3	GTTAGT ... TACTAACAG ... ATTTAG
cel6-4	GTAAGT ... TACTAACCC ... AACTAG
cel7A-1	GTAAGC ... CGCTAACAT ... GTGAAG
cel7A-2	GTGAGT ... TACTGACTA ... ACACAG
cel7B-1	GTAAGT ... AACTGACAT ... TTTTAG
cel45-1	GTATGT ... TGCTAACTG ... TCCAAG
ace-1	GTACGG ... AACTAACGG ... ACTTAG
ace-2	GTAAGT ... TACTTATCG ... TTAAAG
ace-3	GTATGT ... AACTAACTT ... ACAAAG
consens	GTDHGB ... HRCTNAYNN ... NNNHAG
brown	GTRDGW ... NDYTRABNH ... YNRHAG
gurr	GTANGT ... YGCTAACN ... YAG

Abb. 3.38: Intronalignment der Intron Grenzen und der internen Verzweigungsstellen von elf Introns der Gene *cel6* (*cel6-1* bis *cel6-4*), *cel7A* (*cel7A-1* und *cel7A-2*), *cel7B* (*cel7B-1*), *cel45* (*cel45-1*) und *ace1* (*ace-1* bis *ace-3*) aus *F. graminearum* K59. Es wurde eine Konsensussequenz der Intron Grenzen und der internen Verzweigungsstelle für *F. graminearum* abgeleitet (*consens*) und mit den Konsensussequenzen aus filamentösen Pilzen (*gurr*) [Gurr *et al.*, 1987] und Fusarien (*brown*) [Brown *et al.*, 2001] verglichen. Invariante Nukleotide sind grau hinterlegt und hervorgehoben. D = (GAT), H = (ATC), R = (AG), N = (ATGC), Y = (CT), B = (GCT), W = (AT).

Dabei zeigte sich, dass die invarianten Nukleotide der Intron Grenzen (**GTxxG...AG**) und der internen Verzweigungsstelle (**TxA**) in allen Introns vorhanden sind, während die flankierenden Nukleotide von den bekannten Konsensussequenzen zum Teil abweichen (Abb. 3.38). Alle untersuchten Introns aus *F. graminearum* haben ein weiteres invariantes Nukleotid (C) in der Verzweigungsstelle, das dem T unmittelbar vorgelagert ist, so dass in *F. graminearum* die Verzweigungsstelle die Sequenz **CTxA** hat (nach Brown *et al.* [2001] kann das C durch ein T ersetzt werden). Insgesamt scheinen die Nukleotide außerhalb der invarianten Stellen beliebig setzbar zu sein und zeigen auch innerhalb von *F. graminearum* eine große Variabilität.

Die von Brown *et al.* [2001] ermittelte durchschnittliche Introngröße von 60 bp mit einer Spanne von 49 bis 90 bp je Intron konnte mit einer Einschränkung bestätigt werden. Das erste Intron des *ace1*-Gens ist mit 291 bp wesentlich länger als der Durchschnitt und weicht auch von der bei Brown *et al.* [2001] angegeben Maximallänge von 90 bp deutlich ab. Rechnet man dieses Intron nicht mit ein, so

ergibt sich bei den zehn verbleibenden Introns aus *F. graminearum* ein Durchschnitt von 54 bp mit einer Spanne von 49 bis 63 bp.

3.4 „Survey“ von Genen mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in *F. graminearum* PH-1

Die pflanzliche Zellwand besteht überwiegend aus Zuckerpolymeren, die durch ihre Quervernetzung für die Stabilität der Wände verantwortlich sind. Um dieses Netzwerk zu durchbrechen, sind Phytopathogene auf die Aktivität einer ganzen Reihe von Enzymen angewiesen [de Vries, 2003].

Durch die Veröffentlichung des Genoms von *F. graminearum* PH-1 im Internet (Whitehead Institute / MIT Center for Genome research) war es möglich, das Potential von *F. graminearum* in Bezug auf Gene mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt wird zunächst das genetische Potential der Cellulasen untersucht (Kapitel 3.4.1). Kapitel 3.4.2 beschreibt das genetische Potential der β -Glucosidasen, in Kapitel 3.4.3 wird ein Überblick über mögliche Gene von Transkriptionsfaktoren gegeben, die an der Regulation von Genen zellwandabbauender Enzyme beteiligt sein könnten. Den Abschluss bildet ein Überblick über alle bisher im Genom gefundenen Gene mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände (Kapitel 3.4.4).

3.4.1 „Survey“ von Cellulasen

Um in Genom von *F. graminearum* PH-1 Gene von Cellulasen zu finden, wurden bei der Suche über blastn, blastx oder blastp bekannte Protein- und Nukleotidsequenzen von Cellulasen verwandter Arten verwendet (Kapitel 2.5). Es konnten auf diese

Ergebnisse

Weise 24 Gene identifiziert werden, deren Proteinprodukte Homologien zu Cellulasen unterschiedlicher GH-Familien aufweisen (Tab. 3.6, s. Anhang Tab. A.3).

Tab. 3.6: GH-Familien mit Cellulasen (laut CAZy-Datenbank) und Anzahl der Cellulasen einer bestimmten GH-Familie in *F. graminearum* PH-1.

GH-Familien mit Cellulasen	Cellulasen in <i>F. graminearum</i> PH-1
5	4
6	1
7	2
8	keine
9	keine
10	keine
12	2
26	keine
44	keine
45	1
48	keine
51	keine
61	13
74	1

Cellulasen lassen sich laut der CAZy-Datenbank in den GH-Familien 5-10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 und 74 finden. *F. graminearum* PH-1 weist keine Cellulasen auf, die den GH-Familien 8, 9, 10, 26, 44, 48 und 51 zugeordnet werden können. Lediglich zu den GH-Familien 5, 6, 7, 12, 45, 61 und 74 lassen sich Cellulasen zuordnen. Die Verteilung der Cellulasen auf die GH-Familien ist sehr unterschiedlich. So weisen die GH-Familien 6, 45 und 74 nur eine Cellulase, die GH-Familien 12 und 7 zwei und die GH-Familie 5 vier Cellulasen auf. Die meisten Cellulasen (13) aus *F. graminearum* PH-1 stammen aus der GH-Familie 61 (Tab. 3.6).

Lediglich zwei der 24 Cellulasen zeigen Homologien zu Exocellulasen (Cel6 und Cel7A, Tab 3.7, Kapitel 3.1).

Cellulasen setzen sich aus zwei bis drei Modulen zusammen. Neben der katalytischen Domäne, deren Einordnung in die verschiedenen Familien bereits

Ergebnisse

beschrieben wurde, besitzen Cellulasen ein Signalpeptid, das den Transport des Proteins aus der Zelle steuert. Das Signalpeptid ist bei den in *F. graminearum* PH-1 identifizierten Cellulasen zwischen 16 und 28 Aminosäuren lang. Lediglich zwei Cellulasen, Cel5C und Cel5D, weisen kein Signalpeptid auf (Tab. 3.7).

Als drittes Modul tritt in einigen Fällen ein CBM („Carbohydrate binding module“) auf. Eine solche Domäne konnte in fünf Cellulasen eindeutig bestimmt werden (Cel5A, Cel6, Cel7A, Cel45 und Cel61M, Tab 3.7, Kapitel 3.1). Alle Exocellulasen weisen ein CBM auf (Cel6 und Cel7A), während bei den Endocellulasen lediglich drei CBMs gefunden werden konnten (Cel5A, Cel45 und Cel61M). Damit konnten in 19 Endocellulasen keine CBMs identifiziert werden (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Cellulasen aus *F. graminearum* PH-1. Angeben sind der Spaltungstyp (Endo oder Exo) und das Vorkommen von CBMs und Signalpeptiden mit Spaltungsstellen (s. Anhang Tab. A.3).

Nr.	Cellulase	Typ	CBM	Signalpeptid
1	Cel5A	Endocellulase	ja	ja (22/23)
2	Cel5B	Endocellulase	nein	ja (18/19)
3	Cel5C	Endocellulase	nein	nein
4	Cel5D	Endocellulase	nein	nein
5	Cel6	Exocellulase	ja	ja (18/19)
6	Cel7A	Exocellulase	ja	ja (17/18)
7	Cel7B	Endocellulase	nein	ja (18/19)
8	Cel12A	Endocellulase	nein	ja (18/19)
9	Cel12B	Endocellulase	nein	ja (16/17)
10	Cel45	Endocellulase	ja	ja (17/18)
11	Cel61A	Endocellulase	nein	ja (21/22)
12	Cel61B	Endocellulase	nein	ja (28/29)
13	Cel61C	Endocellulase	nein	ja (21/22)
14	Cel61D	Endocellulase	nein	ja (24/25)
15	Cel61E	Endocellulase	nein	ja (20/21)
16	Cel61F	Endocellulase	nein	ja (20/21)
17	Cel61G	Endocellulase	nein	ja (17/18)
18	Cel61H	Endocellulase	nein	ja (20/21)
19	Cel61I	Endocellulase	nein	ja (19/20)
20	Cel61J	Endocellulase	nein	ja (18/19)
21	Cel61K	Endocellulase	nein	ja (16/17)
22	Cel61L	Endocellulase	nein	ja (19/20)
23	Cel61M	Endocellulase	ja	ja (19/20)
24	Cel74	Endocellulase	nein	ja (16/17)

3.4.2 „Survey“ von β -Glucosidasen

Um in Genom von *F. graminearum* PH-1 Gene von β -Glucosidasen zu finden, wurde wie bereits bei den Cellulasen beschrieben verfahren (Kapitel 3.4.1).

Es konnten im Genom von *F. graminearum* PH-1 21 Gene identifiziert werden, deren Proteinprodukte Homologien zu β -Glucosidasen aufweisen (s. Anhang Tab. A.3). Laut CAZy-Datenbank lassen sich in den GH-Familien 1, 3 und 9 β -Glucosidasen finden. In *F. graminearum* PH-1 konnten aus den GH-Familien 1 und 3 β -Glucosidasen identifiziert werden, β -Glucosidasen der GH-Familie 9 fehlen. Die Verteilung der β -Glucosidasen in die beiden GH-Familien ist sehr unterschiedlich. So lassen sich zu der GH-Familie 1 drei β -Glucosidasen zuordnen (Gluc1A bis Gluc1C), während sich zu der GH-Familie 3 18 β -Glucosidasen rechnen lassen (Gluc3A bis Gluc3R, Tab. 3.8).

Sowohl in GH-Familie 1 als auch in GH-Familie 9 sind neben β -Glucosidasen auch andere Enzyme beschrieben [CAZy-Datenbank]. Alle Proteine der GH-Familie 1 aus *F. graminearum* sind β -Glucosidasen, während die GH-Familie 3 neben den 18 β -Glucosidasen auch andere Enzyme enthält.

Keine der β -Glucosidasen besitzt neben der katalytischen Domäne ein CBM. Neun der 21 β -Glucosidasen weisen ein Signalpeptid für den Transport der Enzyme aus der Zelle auf, während diese Region bei den restlichen zwölf β -Glucosidasen nicht zu finden ist. Das Signalpeptid der β -Glucosidasen ist zwischen 16 und 23 Aminosäuren lang. Es gibt in beiden Familien sowohl β -Glucosidasen mit, als auch ohne Signalpeptid (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: β -Glucosidasen aus *F. graminearum* PH-1. Angeben sind das Vorkommen von CBMs und Signalpeptiden mit Spaltungsstellen (s. Anhang Tab. A.3).

Nr.	β -Glucosidase	CBM	Signalpeptid
1	Gluc1A	nein	nein
2	Gluc1B	nein	nein
3	Gluc1C	nein	ja (18/19)
4	Gluc3A	nein	ja (18/19)
5	Gluc3B	nein	nein
6	Gluc3C	nein	ja (18/19)
7	Gluc3D	nein	nein
8	Gluc3E	nein	nein
9	Gluc3F	nein	nein
10	Gluc3G	nein	nein
11	Gluc3H	nein	nein
12	Gluc3I	nein	ja (21/22)
13	Gluc3J	nein	nein
14	Gluc3K	nein	ja (23/24)
15	Gluc3L	nein	nein
16	Gluc3M	nein	nein
17	Gluc3N	nein	ja (19/20)
18	Gluc3O	nein	ja (18/19)
19	Gluc3P	nein	ja (16/17)
20	Gluc3Q	nein	ja (22/23)
21	Gluc3R	nein	nein

3.4.3 „Survey“ von Transkriptionsfaktoren

Um im Genom von *F. graminearum* PH-1 Gene von Transkriptionsfaktoren zu finden, wurde wie bereits bei den Cellulasen beschrieben verfahren (Kapitel 3.4.1). Es konnten im Genom von *F. graminearum* PH-1 sechs Gene gefunden werden, die die Transkriptionsfaktoren ACEI („activator of cellulase expression“, Kapitel 3.2), CRE („catabolite repressor“), XlnR („xylanase regulatory protein“) und HAP kodieren (Tab 3.9 und Anhang Tab. A.3). Ein Gen zur Kodierung des Transkriptionsfaktors ACEII („activator of cellulase expression“) konnte nicht identifiziert werden. Die Gene der Transkriptionsfaktoren XlnR und ACEI sind in der veröffentlichten Sequenz von *F. graminearum* PH-1 nur unvollständig vorhanden (s. Anhang Abb. A.9 und A.10).

Tab. 3.9: Transkriptionsfaktoren aus *F. graminearum* PH-1 (s. Anhang Tab. A.3).

Nr.	Protein	Nr.	Protein
1	CRE	4	HAP2
2	XlnR	5	HAP3
3	ACEI	6	HAP5

3.4.4 Stammbaum von Cellulasen und β -Glucosidasen

Cellulasen und β -Glucosidasen werden anhand von Aminosäuresequenzhomologien in die Familien der „Glycoside Hydrolases“ (GH) eingeordnet. Alle Mitglieder einer GH-Familie haben ähnliche Proteinsequenzen, die sich von den Proteinsequenzen anderer GH-Familien unterscheiden. Um die Verwandtschaft der Mitglieder einer GH-Familie zu untersuchen und die Zugehörigkeit der Enzyme zu einer GH-Familie zu überprüfen, wurde ein Stammbaum aller Cellulasen und β -Glucosidasen aus *F. graminearum* PH-1 erstellt (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2, Abb. 3.39, s. Anhang Tab. A.3).

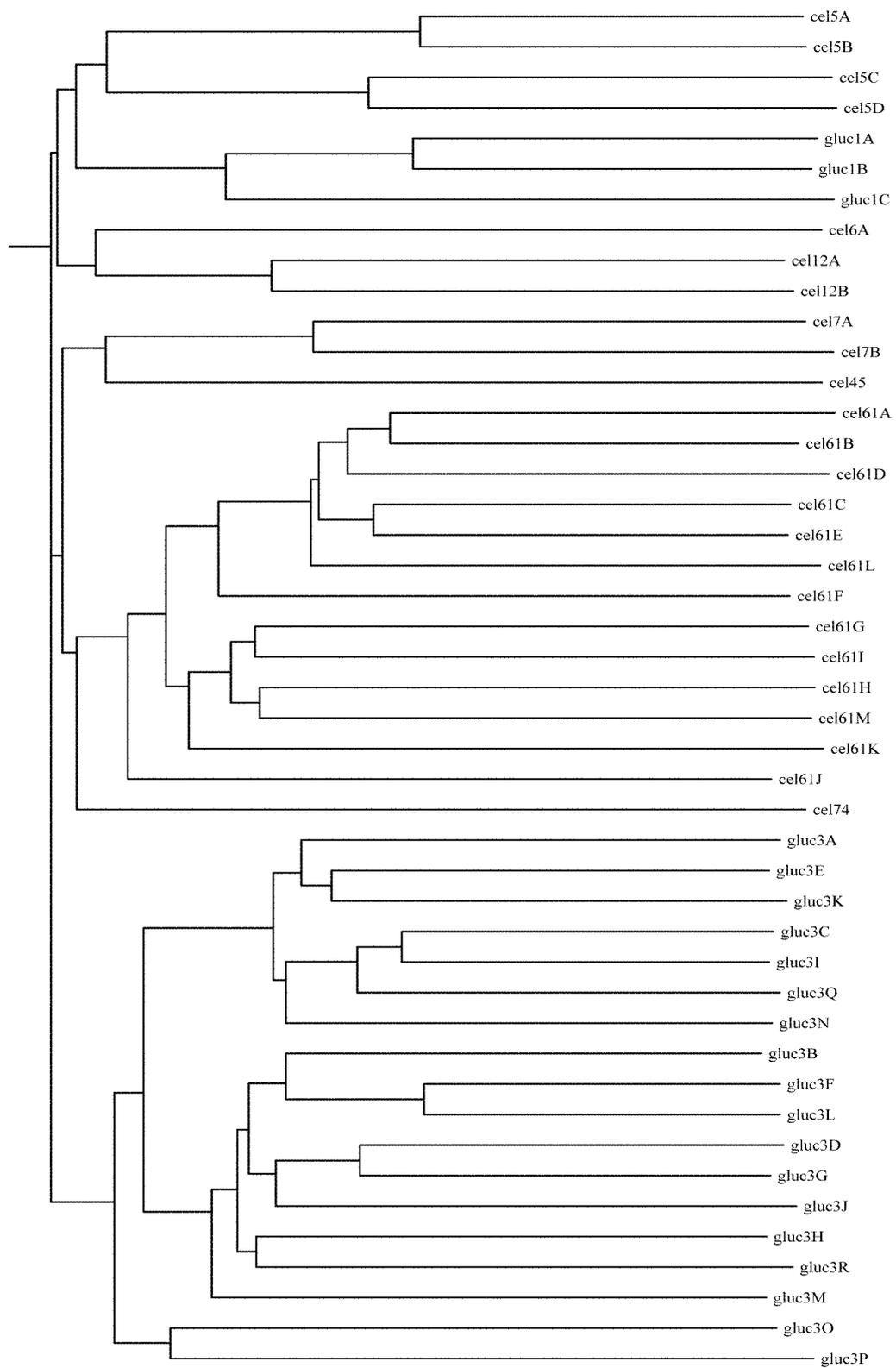


Abb. 3.39: Stammbaum aller Cellulasen und β -Glucosidasen aus *F. graminearum* PH-1 (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 und Anhang Tab. A.3). Quelle: Abbildung erstellt mit Phylip.

Alle Cellulasen und β -Glucosidasen werden entsprechend ihrer GH-Familienzugehörigkeit eingruppiert. Es lassen sich drei große Gruppen in Abbildung 3.39 unterscheiden. In der ersten Gruppe finden sich die Enzyme der GH-Familien 1, 5, 6 und 12. Die β -Glucosidasen der GH-Familie 1 werden nicht mit den β -Glucosidasen der GH-Familie 3 gruppiert (s.u.). Bei den Cellulasen der ersten Gruppe handelt es sich sowohl um Endocellulasen (GH-Familien 5 und 12), als auch um eine Exocellulase (GH-Familie 6). Die GH-Familien 5 und 12 bilden jeweils eigene Untergruppen, das Einzelenzym der GH-Familie 6 zeigt die größte Verwandtschaft zu den Mitgliedern der GH-Familie 12. In der zweiten Gruppe befinden sich die Enzyme der GH-Familien 7, 45, 61 und 74. In dieser Gruppe befinden sich sowohl Endocellulasen (GH-Familien 7, 45, 61 und 74), als auch eine Exocellulase (GH-Familie 7). β -Glucosidasen kommen in der zweiten Gruppe nicht vor. Die Mitglieder der GH-Familien 7 und 61 bilden jeweils eigene Untergruppen. Die Einzelenzyme der GH-Familien 45 und 74 zeigen die größte Verwandtschaft zu den Mitgliedern der Gruppe 7 und 61. In der dritten Gruppe befinden sich ausschließlich β -Glucosidasen der GH-Familie 3.

3.4.5 Übersicht über Enzyme und Transkriptionsfaktoren mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in *F. graminearum* PH-1

Der Zellwandabbau ist ein komplizierter biochemischer Prozess, an dem zahlreiche Enzyme und Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Eine noch unvollständige Liste von Enzymen und Transkriptionsfaktoren mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände zeigt Tabelle 3.10.

Tab. 3.10: Unvollständige Liste von Enzymen und Transkriptionsfaktoren mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in *F. graminearum* PH-1. Angegeben ist die Zuordnung zu einer GH-Familie (soweit möglich), die Funktion des Proteins und die Anzahl in *F. graminearum* PH-1.

GH-Familie	Typ	Anzahl
1	β -Glucosidase	3
3	β -Glucosidase	18
3	Xylosidase	1
5	Mannanase	2
5	Endocellulase	4
6	Exocellulase	1
7	Exo- / Endocellulase	2
10	Xylanase	4
11	Xylanase	3
12	Endocellulase	2
35	Galactosidase	2
43	Xylosidase	4
43	Xylanase	1
45	Endocellulase	1
51	Arabinofuranosidase	1
54	Arabinofuranosidase	1
61	Endocellulase	13
62	Arabinofuranosidase	1
74	Endocellulase	1
--	Cutinase	5
--	Pektatlyase [Conze, 2003]	2
--	Protease [Hellweg, 2003]	2
--	ACEI	1
--	CRE	1
--	XlnR	1
--	HAP	3
Summe		80

Wie bereits beschrieben, sind im Genom von *F. graminearum* PH-1 24 Gene zu finden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Cellulasen kodieren (Kapitel 3.4.1). Das entspricht bei einer Gesamtanzahl von 11640 (Whitehead Institute / MIT Center for Genome research) einem Anteil von 0,21 %. Zusammen mit den teilweise ebenfalls am Abbau von Cellulose beteiligten β -Glucosidasen (21 Gene, 0,18 % aller Gene, Kapitel 3.4.2) kodieren 0,39 % der Gene von *F. graminearum* PH-1 Enzyme mit wahrscheinlicher Beteiligung am Abbau von Cellulose. Rechnet man die in Tab. 3.10 gelisteten Xylanasen (acht Gene), Xylosidasen (fünf Gene), Mannanasen (zwei

Ergebnisse

Gene), Galactosidasen (zwei Gene), Arabinofuranosidasen (drei Gene), Cutinasen (fünf Gene), Pektatlyasen (zwei Gene), Proteasen (zwei Gene) und die Transkriptionsfaktoren (sechs Gene) mit ein, so kommt man auf 80 Gene (oder 0,69 % aller Gene von *F. graminearum* PH-1) die Proteine mit einer möglichen Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände kodieren.

4 Diskussion

Fusarium graminearum ist als Phytopathogen wirtschaftlich bedeutender Gräser wie Weizen und Mais weltweit bekannt. Die Infektion der Wirtspflanzen mit dem nur unzureichend kontrollierbaren Pathogen kann zu erheblichen Ernteverlusten führen. An der Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien wird intensiv gearbeitet; das lückenhafte Wissen über den Infektionsprozess des Pilzes erschwert diese Arbeiten jedoch erheblich.

Die im Verlauf dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten sollten der weiteren Aufklärung des Infektionsprozesses von *F. graminearum* dienen. Der enzymatische Abbau pflanzlicher Zellwände ist vermutlich ein wichtiger Teil des Infektionsprozesses von *F. graminearum*. Durch die Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwandpolymere könnte sich der Pilz einerseits Energie zur weiteren Besiedlung seiner Wirtspflanze verschaffen, andererseits könnte die Schwächung der Zellwände durch den Abbau der Wandpolymere für die Penetration, und damit für eine vollständige Besiedlung des Wirtsgewebes, unerlässlich sein. Dem Abbau von Cellulose könnte dabei eine wichtige Rolle zukommen, da das Polymer als Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände ein wichtiger Stabilitätsfaktor ist und sich Glucose als das Endprodukt des Celluloseabbaus leicht metabolisieren lässt.

Die Transkription von Genen zellwandabbauender Enzyme ist in der Regel reguliert. Die Regulation wird über Transkriptionsfaktoren vermittelt, die an die Promotoren ihrer Zielgene binden. Einzelne Transkriptionsfaktoren regulieren dabei die Transkription mehrerer Gene (z.B. mehrerer Cellulasegene) gleichzeitig und haben somit einen erheblichen Einfluss auf die Expression der am Infektionsprozess beteiligten Enzyme zum Abbau von Cellulose und anderer Zellwandpolymere [Suto und Tomita, 2001; Lynd *et al.*, 2002; Schmoll und Kubicek, 2003].

Um einen Einblick in das bisher bei *F. graminearum* kaum untersuchte Enzymsystem zum Abbau von Cellulose zu bekommen, wurden zunächst die Cellulasegene aus *F. graminearum* untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden im Kapitel 4.1 diskutiert. Ergänzend zu den Cellulasen wurden weitere

Proteine mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in *F. graminearum* identifiziert (Kapitel 4.2).

Die Ergebnisse zur Rolle des an der Regulation von Cellulasegenen beteiligten Transkriptionsfaktors ACEI für die Virulenz bzw. Pathogenität des Pilzes werden in Kapitel 4.3 diskutiert.

4.1 Das Cellulasesystem von *F. graminearum*

4.1.1 Cellulasegene aus *F. graminearum* K59

Mit Hilfe heterologer Primer konnten vier Cellulasegene (*cel6*, *cel7A*, *cel7B* und *cel45*) im Genom von *F. graminearum* K59 identifiziert, sequenziert und charakterisiert werden (Kapitel 3.1).

In den Nukleotidsequenzen der vier Gene konnten acht Introns identifiziert werden, die alle die typischen, invarianten Nukleotide der Introngrenzen und der internen Verzweigungsstelle filamentöser Pilze aufweisen (Abb. 3.38, Kapitel 3.3). Die Größe aller acht Introns liegt zudem innerhalb der von Brown *et al.* [2001] ermittelten Spanne von 49 bis 90 bp für Introns des Trichothecen Clusters aus Fusarien [Gurr *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 2001]. Sowohl die Länge als auch die Sequenz der Introns entsprechen somit den Erwartungen.

Die kodierenden Sequenzen der vier Cellulasegene aus *F. graminearum* K59 weisen hohe Homologien zu Cellulasegenen verwandter Pilze auf. Die höchsten Identitäten (rund 80 %) bestehen zu kodierenden Sequenzen von Cellulasegenen aus *F. oxysporum* (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Die Längen der kodierenden Sequenzen der Cellulasegene beider Organismen unterscheiden sich zudem kaum voneinander [Sheppard *et al.*, 1994]. Die hohen Homologien der kodierenden Sequenzen der untersuchten Cellulasegene zwischen *F. graminearum* und *F. oxysporum* konnten aufgrund der verwandtschaftlichen Nähe der beiden Pilze erwartet werden.

4.1.2 Transkription der Cellulasegene *cel6*, *cel7A*, *cel7B* und *cel45*

Die Untersuchungen zur Transkription der vier Cellulasegene zeigten, dass keines der Gene konstitutiv transkribiert wird (Kapitel 3.1.1.2 und 3.1.2.2).

Nach 48 und 96 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle konnten mit einer Ausnahme keine Transkripte der Cellulasegene nachgewiesen werden. Lediglich das *cel45*-Gen wurde nach 48 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle transkribiert.

Die Gene zellwandabbauender Enzyme werden bei Anwesenheit von leicht zu metabolisierenden Zuckern wie Glucose in der Regel nicht transkribiert [Ronne, 1995; Lynd *et al.*, 2002]. Dieses auch als „carbon catabolite repression“ bekannte Phänomen konnte auch bei der Transkription pilzlicher Cellulasegene bereits mehrfach beobachtet werden [Ilmen *et al.*, 1997; Margolles-Clark *et al.*, 1997; Suto und Tomita, 2001; Murray *et al.*, 2003]. Eine Transkription der vier Cellulasegene bei Wachstum von *F. graminearum* K59 in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle war daher nicht erwartet worden und konnte mit einer Ausnahme auch nicht beobachtet werden.

Die Transkription des *cel45*-Gens nach 48 h Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle scheint zunächst ungewöhnlich. Betrachtet man allerdings den vermuteten Regulationsmechanismus von Cellulasen etwas genauer, so bietet sich eine Erklärung an: Die Induktion der Transkription von Cellulasen startet mit löslichen Abbauprodukten des Substrates Cellulose. Diese Abbauprodukte werden vermutlich von konstitutiv exprimierten Cellulasen freigesetzt. Sind keine leicht zu metabolisierenden Zucker wie Glucose vorhanden, dann induzieren diese Abbauprodukte die Transkription weiterer Cellulasegene [Béguin und Aubert, 1994; Seiboth *et al.*, 1997; Suto und Tomita, 2001; Schmoll und Kubicek, 2003]. Die Cellulase 45 (vom *cel45*-Gen kodiert) könnte an der Produktion dieser Abbauprodukte beteiligt und für die Induktion der Transkription weiterer Cellulasegene von Bedeutung sein. Auch bei *Phanerochaete chrysosporium* konnte die Transkription zweier Cellobiohydrolasegene (*cbh1-1* und *cbh1-2*) nach

Diskussion

Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle bereits nachgewiesen werden [Vallim *et al.*, 1998].

Das Fehlen von Transkripten des *cel45*-Gens nach 96 h Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle und nach 48 h Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand als Kohlenstoffquelle widerspricht der Rolle der Cellulase 45 als „Scouting-Enzym“ zunächst, da eine konstitutive Transkription des Gens nicht erfolgt. Neben dem Absinken der Transkriptionsraten unter die Nachweisgrenze der RT-PCRs kann eine lediglich transiente Transkription des *cel45*-Gens das Fehlen der Transkripte erklären. Für die potentielle Freisetzung von Induktoren aus Cellulose sind vermutlich nur geringe Mengen an Cellulasen nötig. Eine konstitutive Expression von Cellulasen würde daher einen hohen Energieeinsatz erfordern, der bei Anwesenheit von Glucose bzw. Abwesenheit von Cellulose unnötig wäre. Ein nur gelegentliches, transientes Transkribieren einiger Cellulasegene könnte genügend Cellulasen für die Produktion von Induktoren aus Cellulose bereitstellen. Der Energieeinsatz zur Produktion dieser Enzyme wäre aber gegenüber einer konstitutiven Expression wesentlich verringert. Ob es sich bei der Cellulase 45 tatsächlich um ein „Scouting-Enzym“ handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend festgestellt werden. Ein Ausschalten des *cel45*-Gens in *F. graminearum* mit einer anschließenden Untersuchung der Transkriptionsinduktion von Cellulasegenen könnte auf die mögliche Bedeutung der Cellulase 45 als „Scouting-Enzym“ hinweisen.

Nach Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Cellulose als einziger Kohlenstoffquelle konnten Transkripte aller Cellulasegene nachgewiesen werden. Lediglich das *cel7B*-Gen wurde nach 96 h Wachstum in Minimalmedium mit Cellulose als Kohlenstoffquelle nicht transkribiert.

Cellulose ist das natürliche Substrat von Cellulasen. Die durch den Abbau von Cellulose freigesetzten Abbauprodukte wie Cellobiose oder aus ihnen gebildete Moleküle wie Sophorose gelten als wahrscheinliche Induktoren der Expression von Cellulasen [Lynd *et al.*, 2002]. Die Transkription von Cellulasegenen nach Wachstum verschiedener Pilze in cellulosehaltigen Medien konnte bereits mehrfach

nachgewiesen werden: *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* und *egl5* aus *T. reesei* [Ilmen *et al.*, 1997], *cel6B* und *cel7A* aus *Lentinula edodes* [Lee *et al.*, 2001], *cel2*, *cel3* und *cel4* aus *Agaricus bisporus* [Chow *et al.*, 1994; Yague *et al.*, 1997] oder *exo1* und *cbh1* aus *Humicola grisea* [Takashima *et al.*, 1998b]. Die Transkription der untersuchten Cellulasegene von *F. graminearum* nach Wachstum in cellulosehaltigen Medien war daher zu erwarten. Warum die Transkription des *cel7B*-Gens bereits nach 96 h Wachstum des Pilzes mit Cellulose als Kohlenstoffquelle nicht mehr nachzuweisen war, kann aus den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

Die Transkription des *cel6*-Gens wurde nach 6 bis 96 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Cellulose als Kohlenstoffquelle untersucht (Tab 3.1 Kapitel 3.1.1.2). Eine Transkription des *cel6*-Gens konnte erst nach 48 h Wachstum nachgewiesen werden. Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf wurde bei der Transkription des *pell*-Gens aus *F. graminearum* festgestellt, das ebenfalls erst nach 48 h Wachstum in einem Medium mit Weizenzellwand transkribiert wurde [Conze, 2003]. Der zeitliche Verlauf der Transkription von Cellulasegenen unterscheidet sich bei Pilzen erheblich. So konnten Ilmen *et al.* [1997] bereits nach 3 h Transkripte von Cellulasegenen in *T. reesei* nachweisen (induziert über Sophorose), während Yague *et al.* [1997] erst nach 72 h Transkripte des *cel2*- und *cel4*-Gens aus *A. bisporus* finden konnten (induziert über Cellulose). Die Vergleichbarkeit der zeitlichen Angaben ist allerdings nur begrenzt möglich. So ist es wahrscheinlich, dass es Unterschiede in der Regulation von Cellulasegenen bei den verschiedenen Pilzarten gibt. Zudem dürften die verschiedenen Kulturmedien, die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen und die verwendeten Nachweismethoden eine Rolle bei der Transkription von Cellulasegenen und ihrer Detektion spielen.

Nach 48 und 96 h Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Weizenzellwand als Kohlenstoffquelle konnten Transkripte aller Cellulasegene nachgewiesen werden. Lediglich das *cel6*- und das *cel45*-Gen wurden erst nach 96 h Wachstum in Minimalmedium mit Weizenzellwand als Kohlenstoffquelle transkribiert.

Weizen ist einer der Wirte von *F. graminearum*. Eine Induktion der Transkription der Cellulasegene durch isolierte Zellwände dieser Wirtspflanze erscheint daher nicht

ungewöhnlich. So konnten auch Sposato *et al.* [1995] die Induktion der Transkription des *cel1*-Gens aus *C. carbonum* nach Wachstum des Pilzes auf Maiszellwänden nachweisen. Pflanzliche Zellwände enthalten einen hohen Anteil an Cellulose, die für die Induktion der Transkription der Cellulasegene verantwortlich sein könnte. Die Induktion der Transkription erfolgt nach Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Weizenzellwand gegenüber der Induktion nach Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Cellulose bei den Cellulasegenen *cel6* und *cel45* verspätet. Diese Verzögerung der Induktion der Transkription könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Cellulose erst aus dem Verbund mit anderen Polymeren herausgelöst werden muss, bevor der Abbau beginnen kann. Andererseits produziert die möglicherweise vor dem Abbau von Cellulose startende Metabolisierung anderer Polymere Induktoren, die auch (einige) Cellulasegene induzieren könnten. So ist beispielsweise bekannt, dass Abbauprodukte von Xylanen die Transkription von Cellulasen induzieren können [Margolles-Clark *et al.*, 1997; Gielkens *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2003]. Auf diese Weise könnte die Transkription des *cel7A*- und *cel7B*-Gens trotz der erschwerten Abbaubedingungen von Cellulose (und den damit fehlenden Induktoren für die Expression von Cellulasen) bereits nach 48 h induziert sein.

Die Transkription des *cel6*-Gens wurde auch nach Wachstum des Pilzes in Minimalmedien mit Sorbitol oder Xylan als einzige Kohlenstoffquelle untersucht. In beiden Fällen konnten keine Transkripte des *cel6*-Gens nachgewiesen werden. Sorbitol gilt als neutrale Kohlenstoffquelle, die die Transkription von Cellulasen weder induziert noch reprimiert [Kubicek und Penttilä, 1998]. Cellulasegene werden bei Wachstum in Medien mit Sorbitol als Kohlenstoffquelle in der Regel nicht transkribiert, wie Untersuchungen der Transkription der Gene *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* und *egl5* aus *T. reesei* [Ilmen *et al.*, 1997; Margolles-Clark *et al.*, 1997] oder des *cel3*-Gens aus *A. bisporus* [Chow *et al.*, 1994] zeigen. Das Fehlen von Transkripten des *cel6*-Gens nach Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Xylan als Kohlenstoffquelle ist in sofern überraschend, als dass eine Transkription von pilzlichen Cellulasegenen nach Wachstum der Pilze in Medien mit Xylan als Kohlenstoffquelle in einigen Fällen bereits gezeigt werden konnte (*cbh1*-Gen aus *T.*

reesei [Margolles-Clark *et al.*, 1997], *cbh2*-Gen aus *Talaromyces emersonii* [Murray *et al.*, 2003] oder die *cbhA*- und *cbhB*-Gene aus *A. niger* [Gielkens *et al.*, 1999]). Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass Cellulosekontaminationen in den verwendeten Xylanen für eine Induktion der Cellulasegene verantwortlich waren [Murray *et al.*, 2003]. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Induktion von Cellulasegenen über Xylan möglich ist, aber nicht alle Cellulasen gleichermaßen betrifft. Da *F. graminearum* über eine große Anzahl von Cellulasen verfügt, ist nicht auszuschließen, dass einige Gene dieser Cellulasen auch über Xylan induzierbar sind.

Für die Cellulasegene *cel6*, *cel7A* und *cel45* konnte eine Transkription auch auf infizierten Weizenähren (*in planta*) nachgewiesen werden. Eine Transkription *in planta* kann als erster Hinweis auf eine Beteiligung des Proteinproduktes des transkribierten Gens bei der Infektion gelten. Die Transkription von Cellulasegenen bei der Infektion von Pflanzen durch phytopathogene Pilze konnte bereits bei anderen Untersuchungen beobachtet werden (Transkription des *cel2*-Gens aus *Leptosphaeria maculans* bei der Infektion von *Brassica* Arten [Sexton *et al.*, 2000] oder die Transkription zweier Cellulasegene aus *Cochliobolus heterostrophus* bei der Infektion von Mais [Lev und Horwitz, 2003]). Trotz der mehrfach nachgewiesenen Transkription von Cellulasegenen bei der Infektion verschiedener Pflanzen durch phytopathogene Pilze scheinen einzelne Cellulasen keinen Einfluss auf die Virulenz oder Pathogenität von phytopathogenen Pilzen zu haben. Durch die Ausschaltung von Cellulasen konnten bisher keine Veränderungen der Virulenz oder Pathogenität von phytopathogenen Pilzen beobachtet werden [Sposato *et al.*, 1995; Annis *et al.*, 1997; de Lorenzo *et al.*, 1997; Idnurm und Howlett, 2001; Lebeda *et al.*, 2001]. Die große Anzahl an Enzymen zum Abbau von Cellulose, der komplexe Mechanismus der Transkriptionskontrolle von Cellulasegenen und die Expression von Cellulasen während der Infektion von Pflanzen lassen dennoch vermuten, dass Cellulasen bei der Infektion von Pflanzen durch phytopathogene Pilze eine wichtige Rolle spielen. Es ist allerdings anzunehmen, dass Cellulasen nicht als Einzelenzyme, sondern nur als Enzymgruppe für phytopathogene Pilze von Bedeutung sind. Es ist mir keine Untersuchung bekannt, in der eine größere Zahl von Cellulasen parallel in einem

phytopathogenen Pilz ausgeschaltet worden wäre, um die Rolle dieser Enzymgruppe bei der Virulenz oder Pathogenität zu untersuchen. Aufgrund der starken Redundanz von Cellulasen (*F. graminearum* besitzt 24 Cellulasegene, Kapitel 3.4.1) ist das parallele Ausschalten aller Cellulasen auch kaum möglich. Dieses Problem kann durch das Ausschalten von Transkriptionsfaktoren zur Regulation von Cellulasegenen teilweise gelöst werden. Durch die Ausschaltung von Transkriptionsfaktoren, die die Transkription einer größeren Anzahl von Cellulasegenen regulieren, könnte der Einfluss dieser Enzyme auf die Virulenz oder Pathogenität von pathogenen Pilzen festgestellt werden. Dieser Ansatz wurde bei der Ausschaltung des Transkriptionsfaktors ACEI in *F. graminearum* in dieser Arbeit mit Erfolg verfolgt (Kapitel 3.2 und 4.3.1).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Transkription der untersuchten Gene zweier Exo- (*cel6* und *cel7A*) und zweier Endocellulasen (*cel7B* und *cel45*) aus *F. graminearum* dem bei Pilzen zu erwartenden Muster entspricht. Prinzipiell konnte die Transkription der Cellulasegene bei Wachstum des Pilzes in Substraten wie Cellulose und Weizenzellwand beobachtet werden, während bei einem Wachstum in Nicht-Substraten wie Xylan, Sorbitol oder Glucose keine Transkription nachgewiesen werden konnte. Ausnahmen von dieser Regel wie die Transkription des *cel45*-Gens nach 48 h Wachstum in Minimalmedium mit Glucose zeigen, dass sich die Transkription der Cellulasegene in *F. graminearum* individuell unterscheiden kann. Unterschiede in der Induktion der Transkription finden sich auch im Vergleich zu anderen Pilzen (z.B. die in *F. graminearum* fehlende Transkription des *cel6*-Gens nach Wachstum in Xylan). Neben Unterschieden in den Promotorsequenzen der Cellulasegene (z.B. vorhandene oder nicht vorhandene Bindemotive für Transkriptionsfaktoren) kann auch die ungleiche Ausstattung der Pilze mit Transkriptionsfaktoren eine Ursache der unterschiedlichen Regulation von Cellulasegenen sein (in *F. graminearum* fehlt beispielsweise der an der Regulation von Cellulasegenen in *T. reesei* beteiligte Transkriptionsfaktor ACEII, Kapitel 3.4.3). Die in drei Fällen nachweisbare Transkription von Cellulasegenen bei der Infektion von Weizenpflanzen deutet auf eine Beteiligung der Cellulasen am Infektionsprozess von *F. graminearum* hin.

4.1.3 Proteinsequenzen von Cel6, Cel7A, Cel7B und Cel45

Die aus den kodierenden Sequenzen der vier Cellulasegene übersetzten Proteinsequenzen weisen hohe Homologien zu Cellulasen verwandter Pilze auf. Die höchsten Identitäten (zwischen 73 und 85 %) bestehen zu Cellulasen aus *F. oxysporum* (Kapitel 3.1.1.3 und 3.1.2.3). Die Längen der Proteinsequenzen der Cellulasen aus *F. graminearum* und *F. oxysporum* unterscheiden sich kaum voneinander [Sheppard *et al.*, 1994]. Die hohen Homologien der Cellulasen zwischen *F. graminearum* und *F. oxysporum* waren aufgrund der verwandtschaftlichen Nähe der beiden Pilze zu erwarten.

Pilzliche Cellulasen bestehen vor dem Export der Proteine mindestens aus einer katalytischen Domäne und einem Signalpeptid. Viele Cellulasen enthalten darüber hinaus ein „Carbohydrate binding module“ (CBM), das über ein Linkerpeptid mit der katalytischen Domäne verbunden ist [Tomme *et al.*, 1995; Ohmiya *et al.*, 1997].

Alle vier untersuchten Cellulasegene aus *F. graminearum* K59 besitzen ein Signalpeptid, das den Export des Enzyms aus der Zelle bewirkt und bei diesem Prozess wahrscheinlich abgespalten wird. Der Export der Enzyme ist für Cellulasen notwendig, da ihr überwiegend unlösliches Substrat Cellulose nicht in die pilzlichen Zellen transportiert werden kann [Béguin und Aubert, 1994]. Pilzliche Signalpeptide für den Export von Proteinen sind zwischen 15 und 30 Aminosäuren lang [Heijne, 1985; Nielsen *et al.*, 1997], wovon auch die hier untersuchten Signalpeptide nicht abweichen (die Länge der Signalpeptide der vier Cellulasen liegt zwischen 17 und 18 Aminosäuren).

Cellulasen können über ein CBM an ihr Substrat Cellulose gebunden werden. Diese Bindung erhöht die Konzentration von Cellulasen auf dem Substrat und wird für die Prozessivität von Exocellulasen verantwortlich gemacht. Es wird weiter vermutet, dass die hauptsächlich für den Abbau kristalliner Cellulose benötigten CBMs einzelne Cellulosemoleküle aus Mikrofibrillen herauslösen und den Abbau kristalliner Cellulose so erleichtern können [Linder und Teeri, 1997; Levy *et al.*,

2002; Lynd *et al.*, 2002]. In drei der vier untersuchten Cellulasen (Cel6, Cel7A und Cel45) konnte ein CBM identifiziert werden. Cel7B besitzt dagegen kein CBM. Die CBMs der Cellulasen Cel6, Cel7A und Cel45 gehören in die Familie I der CBM-Familien. In dieser Familie befinden sich fast ausschließlich pilzliche CBMs (während die anderen CBM-Familien überwiegend bakterielle CBMs enthalten), so dass eine Zugehörigkeit zu dieser Familie erwartet werden konnte. CBMs der Familie I sind zwischen 33 und 40 Aminosäuren lang [Linder und Teeri, 1997], wovon auch die CBMs der Cel6, Cel7A und Cel45 keine Ausnahmen machen. Alle untersuchten CBMs entsprechen der Prosite Signatur für pilzliche CBM und enthalten die für die Bindung an Cellulose wichtigen aromatischen Aminosäuren.

CBMs können im Protein sowohl N- als auch C-terminal vorkommen oder ganz fehlen [Ohmiya *et al.*, 1997]. Das CBM der Cel6 liegt am N-terminalen Ende des Proteins. In der „Glycoside Hydrolase“ (GH)-Familie 6 sind bisher nur Cellulasen mit einem N-terminalen CBM (z.B. CBHII aus *T. reesei* [Rouvinen *et al.*, 1990]) oder Cellulasen ohne CBM (z.B. CBHII aus *Cochliobolus heterostrophus* [Lev und Horwitz, 2003]) bekannt. Das CBM der Cel7A liegt am C-terminalen Ende des Proteins, während ein CBM in Cel7B fehlt. In der GH-Familie 7 sind bisher nur Cellulasen mit einem C-terminalen CBM (z.B. CBHB aus *A. niger* [Gielkens *et al.*, 1999]) oder Cellulasen ohne CBM (z.B. die Exoglucanase EXO1 aus *H. grisea* [Takashima *et al.*, 1998b]) bekannt. Das CBM der Cel45 liegt ebenfalls am C-terminalen Ende des Proteins. In der GH-Familie 45 sind bisher Cellulasen mit einem C-terminalen CBM (z.B. Egl3 aus *H. grisea* [Takashima *et al.*, 1999]), einem N-terminalen CBM (z.B. Endoglucanase RCE2 aus *Rhizopus oryzae*, GenBank BAC53987) oder Cellulasen ohne CBM (z.B. EGI aus *Scopulariopsis brevicaulis* [Nakatani *et al.*, 2000]) bekannt. Die Lage der CBMs in den untersuchten Cellulasen deckt sich somit mit der Lage von CBMs anderer Cellulasen der jeweiligen GH-Familie.

Die CBMs sind über Linkerpeptide mit den katalytischen Domänen der Cellulasen verbunden. Es wird vermutet, dass diese Linkerpeptide für die Flexibilität der katalytischen Domänen sorgen, wenn das CBM an Cellulose gebunden ist [Srisodsuk *et al.*, 1993; Tomme *et al.*, 1995; Receveur *et al.*, 2002]. Ein Linkerpeptid enthalten die drei Cellulasen, die auch ein CBM besitzen (Cel6, Cel7A und Cel45), während

der Cel7B ein Linkerpeptid fehlt. Linkerpeptide zeichnen sich generell durch einen erhöhten Anteil an den Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin aus. Alle drei untersuchten Linkerpeptide der Cellulasen 6, 7A und 45 zeichnen sich ebenfalls durch einen erhöhten Anteil dieser Aminosäuren aus (Kapitel 3.1.1.3 und 3.1.2.3).

Cellulasen werden anhand ihrer Aminosäuresequenzen in die Familien der „Glycoside Hydrolases“ (GH) eingeordnet, von denen es zurzeit über 90 gibt [Henrissat, 1991; Henrissat und Davies, 2000; CAZy-Datenbank]. Die Proteinsequenzen der Cellulasen aus *F. graminearum* K59 konnten über Aminosäuresequenzvergleiche den Familien 6, 7 und 45 zugeordnet werden. Die GH-Familien 6 und 7 listen sowohl Endo- als auch Exocellulasen, während die GH-Familie 45 ausschließlich Endocellulasen enthält [CAZy-Datenbank]. Endo- und Exocellulasen unterscheiden sich in ihrer 3D-Struktur voneinander. Während das aktive Zentrum bei Endocellulasen in einer offenen Grube liegt, befindet es sich bei Exocellulasen innerhalb eines geschlossenen Tunnels [Teeri, 1997; Varrot *et al.*, 1999a/b; Davies *et al.*, 2000; Munoz *et al.*, 2001; Sandgren *et al.*, 2001]. Bei Familien, die sowohl Endo- als auch Exocellulasen enthalten (GH 6 und 7), kann die Berechnung der 3D-Struktur Aufschluss über den wahrscheinlichen Angriffsmodus der Cellulase liefern. Die Berechnung der 3D-Modelle der katalytischen Domänen von Cel7B und Cel45 zeigt das aktive Zentrum in einer offenen Grube und klassifiziert die Cellulasen somit als Endocellulasen. Die Berechnung der 3D-Strukturen der katalytischen Domänen von Cel6 (Abb. 3.13 Kapitel 3.1.1.3) und Cel7A zeigt das aktive Zentrum in einem geschlossenen Tunnel und klassifiziert die Cellulasen somit als Exocellulasen. Die Suche nach Cellulasen in dem Mitte 2003 sequenzierten Genom von *F. graminearum* PH-1 ergab, dass sich keine weiteren Exocellulasen im Genom von *F. graminearum* PH-1 befinden (Kapitel 3.4.1).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Cellulasen aus *F. graminearum* K59 den bei pilzlichen Cellulasen üblichen modularen Aufbau aufweisen. Neben den katalytischen Domänen der Familien 6, 7 und 45 lassen sich in drei der vier Cellulasen CBMs der Familie I finden, die über Linkerpeptide mit den katalytischen

Domänen verbunden sind. Alle vier Cellulasen weisen zudem ein Signalpeptid für den Export der Enzyme aus den pilzlichen Zellen auf. Über die Berechnung von 3D-Modellen der katalytischen Domänen ließen sich die Cellulasen 6 und 7A den Exocellulasen und die Cellulasen 7B und 45 den Endocellulasen zuordnen.

4.1.4 „Survey“ von Cellulasen im Genom von *F. graminearum* PH-1

Bei der Suche nach Cellulasegenen im Mitte 2003 im Internet veröffentlichten Genom von *F. graminearum* PH-1 (Kapitel 2.5) konnten insgesamt 24 Gene gefunden werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Cellulasen kodieren (Kapitel 3.4.1). 14 der über 90 GH-Familien enthalten Cellulasen [CAZy-Datenbank]. In *F. graminearum* PH-1 konnten Cellulasen aus sieben dieser 14 GH-Familien gefunden werden (5, 6, 7, 12, 45, 61 und 74), aus ebenfalls sieben dieser 14 GH-Familien ließen sich keine Cellulasen in *F. graminearum* PH-1 finden (8, 9, 10, 26, 44, 48 und 51; Tab 3.6, Kapitel 3.4.1). In den Familien 8, 9, 26, 44, 48 und 51 befinden sich hauptsächlich bakterielle und pflanzliche Cellulasen, so dass das Fehlen von Cellulasen aus diesen GH-Familien in *F. graminearum* PH-1 nicht überrascht. In *F. graminearum* PH-1 konnten fünf Proteine identifiziert werden, die der GH-Familie 10 angehören, wobei es sich allerdings nicht um Cellulasen, sondern um vier Xylanasen und eine Tomatinase handelt. Erstellt man einen Stammbaum der in *F. graminearum* PH-1 identifizierten Cellulasen (Abb. 3.39), so werden alle Cellulasen entsprechend ihrer GH-Familienzugehörigkeit in Gruppen eingeordnet. Dies war zu erwarten, da die Einteilung der GH-Familien auf Aminosäuresequenzhomologien beruht [Henrissat, 1991; Henrissat und Davies, 2000]. Cellulasen gleicher Familienzugehörigkeit sollten immer eine höhere Homologie aufweisen als Cellulasen unterschiedlicher Familienzugehörigkeit.

Vergleicht man die Cellulasen von *F. graminearum* PH-1 mit gut untersuchten Cellulasen verwandter Pilze, so zeigen sich einige Übereinstimmungen. In *T. reesei* konnten Cellulasen aus exakt denselben GH-Familien wie in *F. graminearum* PH-1 identifiziert werden [Foreman *et al.*, 2003]. Auch bei *Humicola insolens* stammen

alle bisher identifizierten Cellulasen aus den GH-Familien, in die sich auch die Cellulasen aus *F. graminearum* PH-1 eingruppierten lassen (5, 6, 7, 12 und 45) [Schülein, 1997]. Bei einer ersten Durchsicht des Genoms von *Magnaporthe grisea* (Genom veröffentlicht beim Whitehead Institute 2002, www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/) konnten Gene von Cellulasen identifiziert werden, die sich ebenfalls den GH-Familien 5, 6, 7, 12, 45 und 61 zuordnen ließen (unveröffentlichte Daten). Während sich die Zahl der identifizierten Cellulasen von *F. graminearum* PH-1 auf 24 addiert, konnten in *T. reesei* bisher erst zehn und in *H. insolens* erst sieben Cellulasen identifiziert werden. Die Zahl der Cellulasen von *M. grisea* beträgt mindestens 27. Ein Vergleich der Anzahl der identifizierten Cellulasen aus den vollständig sequenzierten Arten *F. graminearum* und *M. grisea* einerseits und den noch nicht sequenzierten Arten *T. reesei* und *H. insolens* andererseits lässt vermuten, dass sich die Zahl der Cellulasen aus *T. reesei* und *H. insolens* in Zukunft weiter erhöhen wird. Es kann daher angenommen werden, dass eine große Anzahl von Cellulasen verschiedener GH-Familien für einen vollständigen Abbau vernetzter Cellulose pflanzlicher Zellwände unverzichtbar ist.

Bei den im Genom von *F. graminearum* PH-1 identifizierten Cellulasen handelt es sich in der Mehrzahl um Endocellulasen (22). Lediglich zwei der Cellulasen sind Exocellulasen (Cel6 und Cel7A, Kapitel 4.1.3). Dieselbe Verteilung zeigt sich in *T. reesei* und *H. insolens*. Auch bei diesen beiden Pilzen sind nur zwei der zehn bzw. sieben Cellulasen Exocellulasen, und auch in *T. reesei* und *H. insolens* handelt es sich dabei um Cellulasen der GH-Familien 6 und 7 [Schülein, 1997; Foreman *et al.*, 2003]. Bei 22 der 27 identifizierten Cellulasen aus *M. grisea* handelt es sich um Endocellulasen. Die Exocellulasen stammen wiederum aus den GH-Familien 6 und 7, *M. grisea* besitzt jedoch mit fünf Exocellulasen (zwei der GH-Familie 6 und drei der GH-Familie 7) mehr Exocellulasen als aus *F. graminearum*, *T. reesei* oder *H. insolens* bekannt sind.

Wie bereits beschrieben, zeigen Cellulasen einen modularen Aufbau. Neben den katalytischen Domänen (Einteilung in GH-Familien s.o.) konnten in fünf der 24 Cellulasen von *F. graminearum* PH-1 CBMs der Familie I nachgewiesen werden. Vergleicht man die Verteilung der CBMs in den Cellulasen von *T. reesei* mit der

Diskussion

Verteilung der CBMs in den Cellulasen von *F. graminearum* PH-1, so stellt man nur in zwei Fällen eine Abweichung fest. Während die Endocellulasen EGI (GH-Familie 7) und Cel74A aus *T. reesei* ein CBM besitzen [Foreman *et al.*, 2003], ließen sich in den entsprechenden Endocellulasen Cel7B und Cel74 aus *F. graminearum* K59 keine CBMs nachweisen.

Ein Signalpeptid für die Sekretion der Cellulasen konnte in 22 der 24 Cellulasen aus *F. graminearum* PH-1 nachgewiesen werden. Lediglich die Cellulasen Cel5C und Cel5D weisen kein Signalpeptid auf. Aufgrund des Fehlens eines Signalpeptides und der damit verbundenen Unerreichbarkeit des potentiellen Substrates Cellulose ist es nicht auszuschließen, dass es sich trotz der vorhandenen Homologien zu Cellulasen anderer Organismen nicht um Cellulasen handelt, sondern um Enzyme anderer (unbekannter) Funktion. Umgekehrt gilt, dass es sich bei den restlichen 22 Proteinen um extrazelluläre Enzyme handelt, eine Eigenschaft, die typisch ist für Cellulasen.

Die Zahl der Endocellulasen ist sowohl in *F. graminearum* (22 Endocellulasen) als auch in *M. grisea* (22 Endocellulasen), *T. reesei* (acht Endocellulasen) und *H. insolens* (fünf Endocellulasen) gegenüber der Zahl der Exocellulasen (*F. graminearum*, *T. reesei* und *H. insolens* jeweils zwei, *M. grisea* fünf Exocellulasen) stark erhöht.

Mögliche Gründe der Redundanz von Endocellulasen in *F. graminearum* könnten sein: (i) die unterschiedlichen Anforderungen an Endocellulasen beim Abbau von Cellulose als Saprophyt oder Pathogen (z.B. unterschiedliche pH- und / oder Temperaturbedingungen oder die Konkurrenz mit anderen Saprophyten oder Pathogenen); (ii) das breite Wirtsspektrum des Pilzes (z.B. unterschiedliche pflanzliche Inhibitoren von Endocellulasen oder Unterschiede im Aufbau der Zellwände verschiedener Wirte); (iii) die Vernetzung der Cellulose mit anderen Polymeren der pflanzlichen Zellwand (Abbau über Endocellulasen mit speziellen Substratspezifitäten) und (iv) der Abbau anderer Wandpolymere wie den „mixed linkage“ β -Glucanen durch spezielle Endocellulasen.

Das Auftreten von jeweils zwei Exocellulasen in *F. graminearum*, *T. reesei* und *H. insolens* lässt sich über den unterschiedlichen Angriffsort der Enzyme erklären. Für *T. reesei* konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Exocellulasen des Pilzes Celluloseketten einmal vom reduzierenden Ende (CBHI) und einmal vom nicht-reduzierenden Ende (CBHII) her angreifen [Barr *et al.*, 1996; Nutt *et al.*, 1998]. Es ist zu vermuten, dass sich die Exocellulasen aus *F. graminearum* in der selben Weise verhalten. Eine Redundanz wie bei den Endocellulasen kann bei den Exocellulasen dieser Pilze also nicht beobachtet werden. Exocellulasen bauen Cellulose fast ausschließlich von den Kettenenden her ab und zerstören die Struktur von Cellulose im Gegensatz zu Endocellulasen nur sehr langsam [Wood, 1992; Lynd *et al.*, 2002]. Ihre Bedeutung bei der Schwächung pflanzlicher Zellwände ist daher gering. Es kann vermutet werden, dass Pflanzen sich bei einer möglichen Abwehr gegen den Abbau von Cellulose auf die Aktivität von Endocellulasen beschränken; die Anzahl von Exocellulasen kann daher begrenzt bleiben. Die Spaltung von Cellulose durch Exocellulasen findet zudem überwiegend an Kettenenden von Molekülen statt, die vorher bereits von Endocellulasen freigelegt und gespalten worden sind. Die Produktion von Exocellulasen, die unterschiedlich vernetzte Celluloseketten angreifen können, ist daher ebenfalls nicht notwendig. Es gibt allerdings Pilze wie *Phanerochaete chrysosporium* [Wymelenberg *et al.*, 2002] oder *M. grisea*, die mehr als zwei Exocellulasen produzieren können. Zwar ist die Verteilung der Exocellulasen auf die GH-Familien wieder mit der der bereits besprochenen Pilze identisch (die Exocellulasen stammen aus den GH-Familien 6 und 7), doch werden nicht wie in *T. reesei*, *H. grisea* oder *F. graminearum* zwei, sondern sieben (*P. chrysosporium*) und fünf (*M. grisea*) Exocellulasen gebildet. Welche Bedeutung die Bildung mehrerer Exocellulasen in diesen Pilzen hat, ist nicht bekannt.

4.1.5 „Survey“ von Glucosidasen im Genom von *F. graminearum* PH-1

Zum vollständigen Abbau von Cellulose wird die Aktivität von Glucosidasen benötigt, die Glucose als das Endprodukt des Celluloseabbaus aus Cellobiose freisetzen. Bei der Suche nach Glucosidasegenen im Mitte 2003 im Internet

veröffentlichten Genom von *F. graminearum* PH-1 (Kapitel 2.5) konnten insgesamt 21 Gene gefunden werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Glucosidasen kodieren (Kapitel 3.4.2). Lediglich drei der über 90 GH-Familien enthalten Glucosidasen [CAZy-Datenbank]. In *F. graminearum* PH-1 konnten Cellulasen aus zwei dieser drei GH-Familien gefunden werden (1 und 3), Glucosidasen der GH-Familie 9 konnten nicht identifiziert werden.

Die Zugehörigkeit der Glucosidasen zu den GH-Familien ist in *F. graminearum* PH-1 und *T. reesei* identisch. Beide Pilze besitzen Glucosidasen aus den GH-Familien 1 und 3, während Glucosidasen der GH-Familie 9 nicht bekannt sind [Foreman *et al.*, 2003]. Wie in *F. graminearum* PH-1 ist die Anzahl der bekannten Glucosidasen in der GH-Familie 1 geringer (zwei Vertreter in *T. reesei*) als die Anzahl der bekannten Glucosidasen der GH-Familie 3 (fünf Vertreter in *T. reesei*). Beide Pilze besitzen Glucosidasen mit Signalpeptiden zum Export der Enzyme (in *F. graminearum* PH-1 neun, in *T. reesei* drei Glucosidasen) und ohne ein solches Signalpeptid [Foreman *et al.*, 2003]. Glucosidasen können neben der Spaltung von Cellobiose auch andere Aufgaben in pilzlichen Zellen übernehmen (z.B. Transglykosylierungsreaktionen [Mach und Zeilinger, 2003], Spaltung von Gentobiose und anderen β -Glucosiden [CD Römpp Chemie Lexikon, 1995]), womit sich die große Anzahl der β -Glucosidasen erklären lässt.

4.1.6 Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit ist es gelungen, das Enzymsystem zum Abbau von Cellulose des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* umfassend zu untersuchen. Im Genom von *F. graminearum* PH-1 konnten 45 Gene identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Enzyme zum Abbau von Cellulose kodieren (Gene von 24 Cellulasen und 21 Glucosidasen). *F. graminearum* besitzt damit das Potential zum vollständigen Abbau von Cellulose zu Glucose. Die Transkription der vier in *F. graminearum* K59 untersuchten Cellulasegene (*cel6*, *cel7A*, *cel7B* und *cel45*) erfolgte nicht konstitutiv. Prinzipiell konnte eine Transkription der Cellulasegene überwiegend nach Wachstum des Pilzes in induzierenden Medien (Cellulose,

Weizenzellwand) nachgewiesen werden, während eine Transkription nach Wachstum des Pilzes in Glucose nur in einem Fall stattfand (*cel45*). Die Transkription der Cellulasegene *cel6*, *cel7A* und *cel45* während der Infektion von Weizen lässt auf eine Beteiligung dieser Cellulasen im Infektionsprozess von *F. graminearum* schließen. Bei den Cellulasen handelt es sich überwiegend um Endocellulasen (22), lediglich zwei Cellulasen konnten als Exocellulasen identifiziert werden.

4.2 Proteine mit möglicher Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände in *F. graminearum* PH-1

Im Genom von *F. graminearum* PH-1 wurden bisher insgesamt 80 Gene identifiziert, die Proteine mit einer möglichen Beteiligung am Abbau pflanzlicher Zellwände kodieren (Tab. 3.10, Kapitel 3.4.5). Neben den Enzymen zum Abbau von Cellulose (24 Cellulasen und potentiell 21 Glucosidasen) konnten 29 Enzyme zum Abbau von Xylan, Xyloglucan, Galactomannan, Pektin, Zellwandproteinen und Cutin sowie sechs Transkriptionsfaktoren zur Regulation von Genen zellwandabbauender Enzyme identifiziert werden. Obwohl die Zahl der am Abbau pflanzlicher Zellwandpolymere beteiligter Proteine bereits jetzt sehr groß ist, werden dieser Liste in Zukunft mit Sicherheit weitere Komponenten hinzugefügt werden können.

4.3 **Transkriptionsfaktoren zur Regulation von Cellulasegenen**

4.3.1 **Der Transkriptionsfaktor ACEI**

4.3.1.1 Sequenz, Transkription und Introns des *ace1*-Gens

Im Genom von *F. graminearum* K59 konnten 2340 bp sequenziert werden, die eine hohe Homologie zur Sequenz des *ace1*-Gens aus *T. reesei* [Saloheimo *et al.*, 2000] aufweisen (Kapitel 3.2.1). Aufgrund eines dem Startcodon vorgelagerten Introns im *ace1*-Gen aus *T. reesei* wurden zusätzlich 742 bp des 5' Bereiches des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* K59 sequenziert.

Der sequenzierte Bereich enthält drei Introns, die alle die typischen, invarianten Nukleotide der Intron Grenzen und der internen Verzweigungsstelle filamentöser Pilze aufweisen (Abb. 3.38, Kapitel 3.3). Die Größe von zwei der drei Introns liegt zudem innerhalb der von Brown *et al.* [2001] ermittelten Spanne von 49 bis 90 bp für Introns des Trichothecen Clusters aus Fusarien [Gurr *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 2001]. Das erste Intron weicht mit einer Länge von 291 bp deutlich von dieser Spanne ab und befindet sich im 5' Bereich des Startcodons des *ace1*-Gens. Über die Funktion des transkribierten, aber nicht translatierten Bereiches stromaufwärts des Startcodons ist nichts bekannt. Auch die Funktion des Introns dieses Bereiches ist unklar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dieses Bereiches inklusive des Introns zwischen *F. graminearum* und *T. reesei* ist allerdings nicht von einer zufälligen, funktionslosen Sequenz auszugehen. Möglich wären Regulationsfunktionen bei der Transkription des Gens oder der Translation der mRNA.

Die Transkription des *ace1*-Gens konnte unter allen untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.2). Es ist davon auszugehen, dass das *ace1*-Gen in *F. graminearum* K59 konstitutiv transkribiert wird. Dies deckt sich mit den Untersuchungen zur Transkription des *ace1*-Gens in *T. reesei* von Aro *et al.* [2003]. Die Transkription des *ace1*-Gens aus *T. reesei* konnte ebenfalls unter allen

untersuchten Bedingungen (nach Wachstum des Pilzes in Glucose, Glycerin, Sorbitol und Cellulose) nachgewiesen werden.

4.3.1.2 Der ACEI Faktor

Die kodierende Sequenz lässt sich in eine Proteinsequenz von 741 Aminosäuren übersetzen (Abb. 3.21, Kapitel 3.2.3). Die Proteinsequenz ist damit in ihrer Länge mit der Aminosäuresequenz des ACEI-Faktors aus *T. reesei* (733 Aminosäuren) vergleichbar, zu der eine Identität von 65 % besteht.

Ein Vergleich der Proteinsequenzen der ACEI-Faktoren von *T. reesei* und *F. graminearum* offenbart die Existenz von zwei Bereichen erhöhter Identität (Boxen), die über eine Linkersequenz geringerer Identität miteinander verbunden sind (Abb. 3.23, Kapitel 3.2.3). Der ersten Box kann keine Funktion aufgrund der Proteinsequenz zugeordnet werden. Es könnte sich um die Region handeln, die der Aktivierung oder Deaktivierung des ACEI-Faktors, z.B. über Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen entsprechender Phosphorylierungsstellen im Protein, dient (der Bereich enthält sechs potentielle Phosphorylierungsstellen). Ebenfalls möglich wäre, dass diese Box mit anderen Proteinen (z.B. anderen Transkriptionsfaktoren) in Wechselwirkung treten kann. Der zweiten Box können zwei Funktionen zugeordnet werden, die in den Proteinen aus *F. graminearum* und *T. reesei* konserviert sind [Saloheimo *et al.*, 2000]. Zum einen handelt es sich um das Kernlokalisationsignal, das den Transport des Proteins in den Zellkern steuert, zum anderen lassen sich drei Zink-Finger Motive finden, die als DNA-Bindedomänen die Bindung des Transkriptionsfaktors an DNA koordinieren.

4.3.1.3 Alternatives Spleißen der internen Introns der *ace1*-mRNA

Die internen Introns des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* würden bei einer Translation zu keinem Abbruch der Proteinsynthese führen und keinen

Leserasterwechsel erzeugen (Kapitel 3.2.4). Das Gleiche konnte für die internen Introns des *aceI*-Gens aus *T. reesei* und des Gens eines hypothetischen Proteins aus *N. crassa* mit Homologien zum *aceI*-Gen aus *T. reesei* festgestellt werden, obwohl sich die Introns der drei Organismen deutlich voneinander unterscheiden. Die Amplifikation und Sequenzierung von cDNA-Fragmenten des *aceI*-Gens aus *F. graminearum* K59 bestätigten die Existenz von Transkripten mit keinem, nur dem ersten, nur dem zweiten Intron oder mit beiden Introns. Aus den damit möglichen vier unterschiedlichen Transkripten des *aceI*-Gens ließen sich bis zu vier verschiedene Proteine translatieren.

Es ist zu vermuten, dass die vier potentiellen ACEI-Faktoren unterschiedliche Funktionen ausüben. Durch die zusätzlichen Aminosäuren der translatierten Intronsequenzen könnte sich die Tertiärstruktur des ACEI-Faktors verändern, mit möglichen Auswirkungen auf zahlreiche Funktionen des ACEI-Faktors wie die Aktivierungseigenschaften, die DNA-Bindfähigkeit oder die Stabilität. Alle sechs untersuchten Intronsequenzen der Gene von *F. graminearum*, *T. reesei* und *N. crassa* enthalten potentielle Phosphorylierungsstellen, von denen in jedem Intron jeweils eine konserviert ist (Abb. 3.28 und 3.29, Kapitel 3.2.4). Zusätzliche Phosphorylierungsstellen könnten zusätzliche Regulationsmöglichkeiten in den gebildeten Transkriptionsfaktoren schaffen. Der Transkriptionsfaktor ACEI ist an der Regulation von Cellulase- und Xylanasegenen (evtl. auch an der Regulation weiterer Gene zellwandabbauender Enzyme) beteiligt. *F. graminearum* PH-1 besitzt 32 Gene, die Cellulasen oder Xylanasen kodieren (Tab 3.10, Kapitel 3.4.5). Die Regulation dieser Gene folgt zwar generellen Mustern wie der Repression bei Anwesenheit von Glucose oder der Induktion bei Anwesenheit von Cellulose oder Xylan, dennoch gibt es individuelle Unterschiede in der Regulation (Kapitel 3.1). Auch wenn einige Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Promotorsequenzen vermittelt werden können, ist die Beteiligung von mehr als den bisher bekannten Transkriptionsfaktoren an der Regulation der großen Zahl von Cellulase- und Xylanasegenen wahrscheinlich. Die Bildung ähnlicher Transkriptionsfaktoren über alternativ gespleißte mRNAs eines Gens könnte ein effektiver Weg sein, eine größere Zahl von Transkriptionsfaktoren zur individuellen Regulation von Cellulase- und Xylanasegenen zu bilden.

Alternatives Spleißen konnte bereits bei mRNAs pilzlicher Gene nachgewiesen werden. So werden die Introns der mRNAs zweier Cellulasegene aus *Phanerochaete chrysosporium* unterschiedlich gespleißt. Das *cbh1.1*- und das *cbh1.2*-Gen enthält jeweils ein Intron, das nur gelegentlich aus der mRNA gespleißt wird. Die Translation der nicht gespleißten mRNAs führt zu Cellulasen mit veränderten CBMs [Sims *et al.*, 1994; Birch *et al.*, 1995]. Auch bei mRNAs von Transkriptionsfaktoren konnte alternatives Spleißen gefunden werden. Aus dem Gen des Zink-Finger Transkriptionsfaktors AREB aus *A. nidulans* können unter anderem über alternatives Spleißen der mRNA drei unterschiedliche Proteine gebildet werden [Conlon *et al.*, 2001].

Ob aus dem *ace1*-Gen aus *F. graminearum* tatsächlich mehr als ein Proteinprodukt gebildet wird, kann anhand der vorliegenden Daten nicht endgültig geklärt werden. Dazu wäre zunächst ein Nachweis der bis zu vier ACEI-Proteine im Mycel des Pilzes notwendig. Über die potentiellen Funktionen der bis zu vier ACEI-Transkriptionsfaktoren könnten dann Untersuchungen mit heterolog exprimierten Proteinen Aufschluss geben.

4.3.1.4 „Knock-out“ des *ace1*-Gens in *F. graminearum*

Die erfolgreiche Integration des Vektors KO1 (Kapitel 2.2.3) in das *ace1*-Gen von *F. graminearum* K59 konnte mit Hilfe von PCRs belegt werden (Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2). Es konnten nach der Integration des KO1-Vektors keine intakten Kopien des *ace1*-Gens im Genom von *F. graminearum* K59 gefunden werden. Die Transkription des unterbrochenen *ace1*-Gens ist auch nach der Integration des KO1-Vektors noch möglich, die Translation des Transkriptes in ein funktionales Protein aber sehr unwahrscheinlich. An der gebildeten mRNA kann lediglich die Translation der ersten 197 Aminosäuren erfolgen, die keine der bekannten Funktionen des ACEI-Faktors (Kernlokalisierungssignal und Zink-Finger Domänen) enthalten. Eine Translation der integrierten Vektorsequenz ist aufgrund zahlreicher Stopcodons ausgeschlossen, so dass auch die der Integrationsstelle folgende Sequenz des *ace1*-

Gens nicht translatiert werden kann. Die Bildung eines funktionalen ACEI-Faktors kann somit so gut wie ausgeschlossen werden.

Die mehrfache Integration des KO1-Vektors in das Genom von *F. graminearum* K59 kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber aus mehreren Gründen wenig wahrscheinlich. Die Transformation von *F. graminearum* ist sehr ineffizient und hat bei mehreren Versuchen überhaupt nur zweimal nachweislich funktioniert. Dass es in diesen Fällen zu einer mehrfachen Integration des KO1-Vektors gekommen ist, erscheint unwahrscheinlich. Die $\Delta ace1$ -Mutante und der Wildtyp zeigen einen identischen Habitus und ein unverändertes Wachstum auf Medien mit Glucose oder Sorbitol als Kohlenstoffquelle (bei denen der fehlende ACEI-Faktor in der $\Delta ace1$ -Mutante vermutlich keine Funktion hat). Zudem zeigt die $\Delta ace1$ -Mutante eine erhöhte Virulenz gegenüber Weizenpflanzen. Bei einer mehrfachen Integration des KO1-Vektors und einer möglichen Zerstörung weiterer Gene ist davon auszugehen, dass die veränderte Proteinexpression komplexe Systeme wie den Stoffwechsel oder die Infektion von Wirtspflanzen negativ beeinflusst, was hier nicht der Fall war.

4.3.1.5 ACEI – Repressor oder Aktivator der Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen?

Der ACEI-Faktor wurde zunächst als Aktivator der Expression von Cellulasegenen beschrieben (Induktion des Promotors des Cellulasegens *cbh1*). Ein „knock-out“ des ACEI-Faktors in *T. reesei* führte zu einem verlangsamten Wachstum des Pilzes auf Agarplatten mit Cellulose als Kohlenstoffquelle [Saloheimo *et al.*, 2000]. Eine weitere Untersuchung kam zu einem gegenteiligen Ergebnis. Der „knock-out“ des ACEI-Faktors in *T. reesei* führte zu einer Abnahme der Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen. Das Wachstum in Flüssigmedien mit Cellulose als Kohlenstoffquelle war nach dem Ausschalten des ACEI-Faktors erhöht [Aro *et al.*, 2003]. Während ACEI in der ersten Untersuchung als Aktivator der Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen beschrieben wurde, musste er nach den Ergebnissen der zweiten Untersuchung als Repressor der Transkription dieser Gene gelten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Wachstum von *F. graminearum* $\Delta ace1$ und *F. graminearum* Wildtyp auf Agarmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen sollten die Rolle des ACEI-Faktors bei der Expression von Cellulase- und Xylanasegenen klären (Kapitel 3.2.5.3).

Das Wachstum von *F. graminearum* auf Minimalmedien mit Glucose oder Sorbitol als Kohlenstoffquelle wurde durch den *ace1*-„knock-out“ nicht beeinträchtigt. Eine Beteiligung des ACEI-Faktors an der Regulation der Gene von Enzymen zur Verwertung von Glucose oder Sorbitol ist daher wenig wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu zeigten sich ab dem vierten Tag erhebliche Unterschiede beim Wachstum von *F. graminearum* $\Delta ace1$ und *F. graminearum* Wildtyp auf Minimalmedien mit Cellulose oder Xylan als Kohlenstoffquelle. Auf beiden Medien verlangsamte sich das Wachstum von *F. graminearum* Wildtyp erheblich, während die Wachstumsgeschwindigkeit von *F. graminearum* $\Delta ace1$ gleich blieb (auf Medien mit Xylan als Kohlenstoffquelle) oder noch zunahm (auf Medien mit Cellulose als Kohlenstoffquelle). Das verlangsamte Wachstum von *F. graminearum* Wildtyp auf den Medien mit Xylan oder Cellulose als Kohlenstoffquelle könnte durch die Umstellung des Stoffwechsels von der Verwertung von Glucose auf die Verwertung von Cellulose oder Xylan zurückzuführen sein. Die erst relativ spät einsetzende Umstellung (nach vier Tagen) kann mit der Animpfung der Agarplatten erklärt werden. Die Animpfung erfolgte über die Platzierung eines Agarstückes in der Mitte der Agarplatten (Kapitel 2.1.2). Diese frisch bewachsenen Agarstücke enthielten glucosehaltiges Medium. Eine Umstellung von der Verwertung von Glucose auf Cellulose erfolgte damit erst, nachdem die Glucose des Agarblockes fast vollständig abgebaut war. Diese mögliche Umstellung des Stoffwechsels war bei dem Wachstum von *F. graminearum* $\Delta ace1$ auf Medien mit Cellulose oder Xylan nicht zu beobachten. Das Fehlen des ACEI-Faktors hat die Umstellung des Stoffwechsels entweder früher einsetzen lassen (also bereits während der Phase, in der noch Glucose verwertet werden konnte) oder komplett überflüssig gemacht (der Abbau von Cellulose und Xylan war von Anfang an möglich). Eine Beteiligung des ACEI-Faktors an der Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen kann nach diesen Ergebnissen auch in *F. graminearum* mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden. Der ACEI-Faktor wirkt in *F. graminearum* vermutlich als Repressor der

Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen, was den Ergebnissen der Untersuchung zur Funktion des ACEI-Faktors in *T. reesei* von Aro *et al.* [2003] entspricht.

4.3.1.6 ACEI als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktor von *F. graminearum*

Die künstliche Infektion von Weizenähren mit *F. graminearum* $\Delta ace1$ und *F. graminearum* Wildtyp zeigte eine erhöhte Virulenz von *F. graminearum* $\Delta ace1$ (Kapitel 3.2.5.4). Die erhöhte Virulenz zeichnete sich bereits zwei Tage nach der Inokulation ab (Abb. 3.37, Kapitel 3.2.5.4). Aufgrund rechtlicher Beschränkungen (Gentechniksicherheit) wurden die infizierten Weizenähren zu diesem Zeitpunkt von den Pflanzen abgetrennt und in sterilen Gläsern weiter inkubiert (Kapitel 2.1.9).

Die Zunahme der Virulenz von *F. graminearum* $\Delta ace1$ war zunächst nicht vermutet worden. Das Ausschalten des Gens des Transkriptionsfaktors ACEI stellt einen massiven Eingriff in das regulative Netzwerk von *F. graminearum* dar. Ein solcher Eingriff sollte bei komplexen Prozessen wie der Infektion von Weizenpflanzen zu Störungen führen, die die Virulenz des Pathogens eher herabsetzen denn erhöhen. Zudem war zu vermuten, dass die gesteigerte Bildung zellwandabbauender Enzyme die Produktion von Elicitoren beschleunigen würde, was zu einer verbesserten Abwehr des Pilzes durch die Pflanze geführt hätte. Die Existenz des ACEI-Faktors ist zudem evolutionär nur schwer erklärbar, wenn seine Ausschaltung sowohl das saprophytische Wachstum beschleunigen als auch die Virulenz des Pilzes erhöhen würde.

Die erhöhte Virulenz von *F. graminearum* $\Delta ace1$ könnte auf die verstärkte Bildung von Cellulasen, Xylanasen und eventuell weiterer zellwandabbauender Enzyme zurückzuführen sein. Eine Zunahme dieser Enzyme könnte den Abbau pflanzlicher Zellwände beschleunigen und so die Tötung des Wirtsgewebes erleichtern. Die Abbauprodukte pflanzlicher Zellwandpolymere gelten als eine der Nahrungsquellen von Fusarien in infizierten Pflanzen [Urbanek, 1989; Kang und Buchenauer, 2000;

Wanjiru *et al.*, 2002]. Durch den beschleunigten Abbau von Polymeren wie Cellulose könnte sich das Nahrungsangebot des Pilzes in der infizierten Pflanze erhöhen, und dies könnte ein verstärktes Wachstum mit einer erhöhten Virulenz zur Folge haben.

Warum besitzt *F. graminearum* einen Transkriptionsfaktor, der sowohl das saprophytische Wachstum bremst als auch die Virulenz des Pathogens beeinträchtigt? Die durchgeführten Versuche fanden unter Laborbedingungen statt. Ob der ACEI-Faktor bei Wachstum in der Natur ebenfalls zu einer Verringerung der Virulenz und zu einer Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit auf Substraten mit Cellulose oder Xylan führt, kann zurzeit nicht beantwortet werden. Es ist zu vermuten, dass der ACEI-Faktor *F. graminearum* unter „realen“ Bedingungen (nicht optimale Umweltbedingungen, Konkurrenzsituationen mit anderen Organismen, Infektion unterschiedlicher Wirte, etc.) einen (unbekannten) Konkurrenzvorteil verschafft.

Neben dem ACEI-Faktor, der außer in *F. graminearum* nur in dem saprophytischen Pilz *T. reesei* untersucht worden ist, gibt es weitere Beispiele für eine Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der Virulenz oder Pathogenität in phytopathogenen Pilzen. So führte das Ausschalten des Transkriptionsfaktors CTF α (ein Aktivator des „zinc binuclear cluster“ Typs) in *Fusarium solani* zu Apathogenität des Pilzes [Li *et al.*, 2001] und das Ausschalten des Transkriptionsfaktors TOXE ρ (bZIP-Faktor, reguliert die HC-Toxinproduktion) führte zu Apathogenität von *C. carbonum* auf Mais [Ahn und Walton, 1998]. Auch die Erhöhung der Virulenz nach dem Ausschalten eines Transkriptionsfaktors konnte bereits beobachtet werden. Die Zink-Finger Transkriptionsfaktoren PAC1 / PACC (Faktoren aus *Sclerotinia sclerotiorum* und *F. oxysporum*) regulieren die Transkription ihrer Zielgene in Abhängigkeit des pH-Wertes. Während in *S. sclerotiorum* die Virulenz nach Ausschalten des Gens stark reduziert war, wurde in *F. oxysporum* eine erhöhte Virulenz nach Ausschalten des PACC-Faktors beobachtet [Caracuel *et al.*, 2003; Rollins, 2003].

Aufgrund der rechtlichen Beschränkungen konnten mit der $\Delta ace1$ -Mutante keine weiteren Versuche durchgeführt werden. Um die Rolle des ACEI-Faktors als

Virulenzfaktor abzusichern, wäre eine Wiederholung des Versuches mit einer weiteren $\Delta ace1$ -Mutante ebenso wünschenswert wie eine Rekonstitution des Wildtyps in der $\Delta ace1$ -Mutante durch Einbringen eines intakten *ace1*-Gens und Untersuchungen zu den Folgen einer Überexpression des ACEI-Faktors in *F. graminearum*.

4.3.2 Transkriptionsfaktoren in *F. graminearum* PH-1

Neben dem Gen des Transkriptionsfaktors ACEI konnten im Genom von *F. graminearum* PH-1 weitere Faktoren identifiziert werden, die an der Regulation von Cellulasegenen beteiligt sind (Transkriptionsfaktoren CRE und XlnR sowie der HAP-Komplex, Kapitel 3.4.3).

CRE Faktoren binden an die Promotoren ihrer Zielgene und verhindern die Transkription dieser Gene, wenn leicht zu metabolisierende Zucker wie Glucose zur Verwertung bereitstehen [Schmoll und Kubicek, 2003]. CRE-Faktoren können als übergeordnete Transkriptionsrepressoren angesehen werden, die bereits in zahlreichen Pilzen gefunden werden konnten [Dowzer und Kelly, 1991; Ilmen *et al.*, 1996; Takashima *et al.*, 1998a; Vautard-Mey *et al.*, 1999; Tudzynski *et al.*, 2000; Felenbok *et al.*, 2001]. Auch im Genom von *F. graminearum* konnte ein Transkriptionsfaktor des CRE-Typs identifiziert werden. Die fehlende Transkription der Cellulasegene *cel6*, *cel7A* und *cel7B* nach Wachstum des Pilzes auf Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle (Kapitel 3.1.1.2 und 3.1.2.2) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Aktivität dieses CRE-Faktors zurückzuführen.

Der Faktor XlnR ist als Aktivator der Transkription von Xylanase- und Cellulasegenen bekannt [van Peij *et al.*, 1998a/b; Gielkens *et al.*, 1999; Marui *et al.*, 2002]. Es handelt sich um einen der wenigen bekannten Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von Genen zellwandabbauender Enzyme aktivieren. Der XlnR-Faktor ist der einzige bekannte Transkriptionsfaktor aus *F. graminearum* K59, der Cellulase- und Xylanasegene aktivieren kann.

Ein Gen des Transkriptionsfaktors ACEII konnte im Genom von *F. graminearum* PH-1 nicht gefunden werden. Dieser Faktor, der bisher nur aus *T. reesei* bekannt ist, ist wie der Faktor XlnR an der Aktivierung von Cellulase- und Xylanasegenen beteiligt [Aro *et al.*, 2001 und 2003]. Obwohl *T. reesei* und *F. graminearum* nahe verwandt sind, unterscheiden sich die beiden Pilze in diesem Punkt deutlich voneinander. Dies belegt einmal mehr, dass die Regulation von Genen zellwandabbauender Enzyme einige Komplexität besitzt und auch zwischen nahe verwandten Arten individuelle Unterschiede in der Regulation dieser Gene bestehen. Die Identifizierung weiterer Regulatoren aus verschiedenen Pilzen ist daher sehr wahrscheinlich. Dabei wäre es interessant zu untersuchen, ob es prinzipielle Unterschiede in der Zusammensetzung des Regulationssystems von Genen zellwandabbauender Enzyme zwischen Saprophyten und Pathogenen gibt.

Der HAP-Komplex, bestehend aus drei DNA-bindenden Proteinen, konnte ebenfalls in *F. graminearum* PH-1 identifiziert werden. Der HAP-Komplex ist an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt, darunter in *T. reesei* auch einige Cellulase- und Xylanasegene [Brakhage *et al.*, 1999; Zeilinger *et al.*, 2001]. Ob der HAP-Komplex auch in *F. graminearum* an der Regulation von Cellulasegenen partizipiert, kann aus den vorliegenden Daten allerdings nicht geschlossen werden.

T. reesei ist der einzige Pilz, in dem bisher alle bekannten Transkriptionsfaktoren gefunden werden konnten, die an der Regulation von Cellulasegenen beteiligt sind (ACEI [Saloheimo *et al.*, 2000], ACEII [Aro *et al.*, 2001], CRE1 [Ilmen *et al.*, 1996], Xyr1 (zu XlnR homologes Protein, GenBank AF479644), HAP-Komplex [Zeilinger *et al.*, 2001]). Obwohl es wahrscheinlich noch weitere Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Transkription von Cellulasegenen gibt, zeichnen sich bereits Unterschiede in der Regulation dieser Gene zwischen nahe verwandten Pilzen wie *T. reesei* und *F. graminearum* ab. In *F. graminearum* PH-1 konnten nur vier der fünf Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (der Faktor ACEII fehlt). Die Transkriptionsfaktoren CRE, XlnR und HAP scheinen weit verbreitet zu sein. Eine ähnliche Situation zeigt sich auch für den Faktor ACEI. Neben *T. reesei* und *F. graminearum* scheinen auch *T. emersonii* und *N. crassa* einen ACEI-Faktor zu besitzen, während er in *S. cerevisiae* fehlt [Saloheimo *et al.*, 2001; GenBank

Diskussion

AY072919]. Es kann daher angenommen werden, dass die Transkriptionsfaktoren CRE, XlnR, HAP und ACEI für die Transkription in filamentösen Pilzen von allgemeiner Bedeutung sind. Dagegen konnte der Transkriptionsfaktor ACEII bisher nur in *T. reesei* nachgewiesen werden. Das Fehlen dieses Faktors in verwandten Pilzen wie *F. graminearum* deutet auf eine speziellere Rolle im Regulationsnetzwerk hin.

5 **Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein weiterer Baustein bei der Aufklärung des Infektionsprozesses des Phytopathogens *F. graminearum*. Zur Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien sind allerdings weitere Untersuchungen dringend erforderlich.

Die Enzyme des Abbaus pflanzlicher Zellwände können durch die Veröffentlichung des Genoms von *F. graminearum* leicht identifiziert werden. Untersuchungen sind daher vor allem in Bezug auf das Zusammenspiel der einzelnen Enzyme, die Rolle der Enzyme in der Virulenz des Pilzes und die Bedeutung der Redundanz innerhalb der Enzymgruppen nötig. Dabei nimmt die Identifizierung von Schlüsselenzymen, die beispielsweise durch die Produktion von Induktoren die Expression weiterer Enzyme des Zellwandabbaus einleiten, eine wichtige Stellung ein. Eine gezielte Ausschaltung dieser Schlüsselenzyme (z.B. über Fungizide) könnte durch die Unterbrechung von Signalkaskaden zu einer verminderten Virulenz von *F. graminearum* und anderen Pathogenen führen. Die Identifizierung dieser Schlüsselenzyme würde darüber hinaus nicht nur die vielfach noch ungeklärten Fragen nach den natürlichen Induktoren der Expression von Genen zellwandabbauender Enzyme beantworten, sondern auch die Aufklärung der zugehörigen Signalkaskaden wesentlich erleichtern.

Transkriptionsfaktoren stehen am Ende der Signalkaskaden zur Regulation der Gene zellwandabbauender Enzyme. Die individuelle Regulation von vielleicht über 100 Genen zellwandabbauender Enzyme erfordert den koordinierten Einsatz einer ganzen Reihe von Transkriptionsfaktoren. Die Identifizierung von weiteren Transkriptionsfaktoren zur Regulation zellwandabbauender Gene ist für das Verständnis des Infektionsprozesses von *F. graminearum* von großer Bedeutung. Nur wenn alle Komponenten des Netzwerkes zur koordinierten Transkription zellwandabbauender Gene bekannt sind, kann ein realistisches Modell der Arbeitsweise dieses Netzwerkes entwickelt werden. Die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren wie ACEI Virulenzfaktoren darstellen, unterstreicht die

Ausblick

Bedeutung dieser Faktoren für phytopathogene Pilze zusätzlich. Transkriptionsfaktoren wie ACEI stellen zudem ideale Targets für Fungizide dar. Sie sind nicht nur an der Regulation einer ganzen Reihe von Genen beteiligt, die Phytopathogene bei der Besiedlung ihrer Wirte vermutlich benötigen, sie scheinen zudem wie im Fall ACEI auf die Gruppe der filamentösen Pilze beschränkt zu sein, was die Wahrscheinlichkeit negativer Auswirkungen auf andere Organismen senkt.

6 Zusammenfassung

Fusarium graminearum ist ein weltweit vorkommendes Pathogen von Gräsern wie Weizen und Mais, das jährlich für erhebliche wirtschaftliche Schäden durch Ernteauffälle und Mycotoxinkontaminationen von Getreide verantwortlich gemacht wird. Zurzeit gibt es keine befriedigende Methode zur Bekämpfung von *F. graminearum*, was unter anderem auf fehlende Kenntnisse des Infektionsprozesses zurückgeführt werden kann. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit der Abbau von Cellulose als wahrscheinlich wichtiger Teil des Infektionsprozesses molekularbiologisch untersucht werden.

Bisher waren keine Cellulasen oder Glucosidasen aus *F. graminearum* bekannt (einzige Ausnahme ist ein kurzes Fragment eines Cellulasegens, Hatsch *et al.*, 2002). Bei der Suche nach Cellulase- und Glucosidasegenen im Genom von *F. graminearum* konnten 45 Gene gefunden werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Cellulasen (24 Gene) und Glucosidasen (21 Gene) kodieren. Untersuchungen zur Transkription von vier (*cel6*, *cel7A*, *cel7B* und *cel45*) der Cellulasegene zeigten, dass die Transkription dieser Gene reguliert wird. Eine Transkription konnte in der Regel nur dann festgestellt werden, wenn *F. graminearum* in Minimalmedien mit Cellulose oder Weizenzellwand als Kohlenstoffquelle wuchs, während eine Transkription bei Wachstum des Pilzes in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle in der Regel nicht nachgewiesen werden konnte. Die Transkription der Cellulasegene *cel6*, *cel7A* und *cel45* während der Infektion von Weizenähren deutet auf eine Beteiligung dieser Cellulasen am Infektionsprozess hin. Die übersetzten Proteinsequenzen der 24 Cellulasegene aus *F. graminearum* weisen den für Cellulasen typischen Aufbau auf. Neben den katalytischen Domänen, die den GH-Familien 5, 6, 7, 12, 45, 61 und 74 zugeordnet werden konnten, konnten in fünf Cellulasen „Carbohydrate binding modules“ gefunden werden. Ein Signalpeptid, das für den Export der Cellulasen nötig ist, konnte in 22 der 24 Cellulasen identifiziert werden (kein Signalpeptid enthielten die Cellulasen Cel5C und Cel5D). Lediglich zwei der Cellulasen konnten als Exocellulasen identifiziert werden, wohingegen 22 Cellulasen als Endocellulasen eingeordnet werden konnten.

Zusammenfassung

Die Transkription von Cellulasegenen wird über Transkriptionsfaktoren gesteuert. Von den fünf bekannten Transkriptionsfaktoren filamentöser Pilze mit einer Beteiligung an der Regulation von Cellulasegenen konnten die Gene der Faktoren CRE, XlnR, ACEI und des HAP-Komplexes im Genom von *F. graminearum* gefunden werden. Ein Gen zur Kodierung des Transkriptionsfaktors ACEII konnte nicht identifiziert werden. Um die Rolle des Transkriptionsfaktors ACEI näher zu untersuchen, wurde das Gen dieses Faktors in *F. graminearum* K59 ausgeschaltet (*F. graminearum* $\Delta ace1$). Es zeigte sich bei einem Vergleich des Wachstums von *F. graminearum* $\Delta ace1$ und *F. graminearum* Wildtyp, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von *F. graminearum* $\Delta ace1$ auf Medien mit Cellulose oder Xylan als Kohlenstoffquelle erhöht war. Das Wachstum von *F. graminearum* $\Delta ace1$ und *F. graminearum* Wildtyp auf Medien mit Glucose oder Sorbitol als Kohlenstoffquelle war dagegen vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigten, dass es sich bei ACEI wahrscheinlich um einen Repressor der Transkription von Cellulase- und Xylanasegenen handelt. Die Infektion von Weizenähren offenbarte eine erhöhte Virulenz von *F. graminearum* $\Delta ace1$ gegenüber *F. graminearum* Wildtyp. Der Transkriptionsfaktor ACEI ist somit ein Virulenzfaktor des Pathogens *F. graminearum*.

7 Literaturverzeichnis

Agrios, G. N. (1997). Plant pathology. 4. Auflage, Academic Press San Diego, USA

Ahn, J. H., P. Sposato P., Kim, S.-I. and Walton, J. D. (2001). Molecular cloning and characterization of *cel2* from the fungus *Cochliobolus carbonum*. Biosci Biotechnol Biochem 65(6): 1406-11.

Ahn, J. H. and Walton, J. D. (1998). Regulation of cyclic peptide biosynthesis and pathogenicity in *Cochliobolus carbonum* by TOXE_p, a novel protein with a bZIP basic DNA-binding motif and four ankyrin repeats. Molecular and General Genetics 260 (5): 462-469.

Andersen, A. L. (1948). The development of *Gibberella zae* headblight of wheat. Phytopathology 38: 595-611.

Annis, S. L. and Goodwin, P. H. (1997). Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. European Journal of Plant Pathology 103: 1-14.

Aoki, T. and O'Donnell, K. (1999). Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia 91(4): 597-609.

Apel-Birkhold, P. C. and Walton, J. D. (1996). Cloning, Disruption, and Expression of Two Endo- β 1,4-Xylanase Genes, *XYL2* and *XYL3*, from *Cochliobolus carbonum*. Applied and Environmental Microbiology 62(11): 4129–4135.

Aro, N., Ilmen, M., Saloheimo, A. and Penttilä, M. (2003). ACEI of *Trichoderma reesei* Is a Repressor of Cellulase and Xylanase Expression. Appl Environ Microbiol 69(1): 56-65.

Literatur

Aro, N., Saloheimo, A., Ilmen, M. and Penttilä, M. (2001). ACEII, a Novel Transcriptional Activator Involved in Regulation of Cellulase and Xylanase Genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 276(26): 24309-24314.

Bagi, F., Balaz, F. and Skrinjar, M. (2000). Pathogenicity and zearalenone production by different *Fusarium graminearum* isolates in artificially infected wheat grain. *Cereal Research Communications* 28(4): 477-484.

Barr, B. K., Hsieh, Y-L., Ganem, B. and Wilson, D. B. (1996). Identification of Two Functionally Different Classes of Exocellulases. *Biochemistry* 35: 586-592.

Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol* 8(5): 548-57.

Beck, R. and Lepschy, J. (2000). Ergebnisse aus dem Fusarium-Monitoring 1989-1999 – Einfluss der produktionstechnischen Faktoren Fruchtfolge und Bodenbearbeitung. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds. *Schriftreihe Bodenkultur und Pflanzenbau der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau* S. 39-47.

Becker, D., Braet C., Brumer III, H., Claeysens M., Divne, C., Fagerström, B. R., Harris, M., Jones, T. A., Kleywegt, G. J., Koivula, A., Piens, K., Sinnott, M. L., Ståhlberg, J., Teeri, T. T., Underwood, M. and Wohlfahrt, G. (2001). Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: the pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/A224H/L225V/T226A/D262G mutant. *Biochem J* 356: 19-30.

Becker, D., Johnson, K. S., Koivula, A., Schülein, M. and Sinnott, M. L. (2000). Hydrolyses of α - and β -cellobiosyl fluorides by Cel6A (cellobiohydrolase II) of *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens*. *Biochem J* 345: 315-319.

Béguin, P. and Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 13(1): 25-58.

Birch, P. R., Sims, P. F and Broda, P. (1995). Substrate-dependent differential splicing of introns in the regions encoding the cellulose binding domains of two exocellobiohydrolase I-like genes in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61(10): 3741-3744.

Boel, E., Hansen, M. T., Hjort, I., Hoegh, I. and Fiil, N. P. (1984). Two different types of intervening sequence in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *EMBO J.* 3:1581–1585.

Boel, E., Hjort, I., Svensson, B., Norris, F., Norris, K. E. and Fiil N. P. (1984). Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* 3:1097–1102.

Boisset, C., Fraschini, C., Schülein, M., Henrissat, B. and Chanzy, H. (2000). Imaging the Enzymatic Digestion of Bacterial Cellulose Ribbons Reveals the Endo Character of the Cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and Its Mode of Synergy with Cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4): 1444–1452.

Boisset, C., Petrequin, C., Chanzy, H., Henrissat, B. and Schülein, M. (2001). Optimized mixtures of recombinant *Humicola insolens* cellulases for the biodegradation of crystalline cellulose. *Biotechnol Bioengl* 72(3): 339-45.

Booth, E. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Bottalico, A. and Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 611–624.

Literatur

Brakhage, A. A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M. A., Tsukagoshi, N. and Hynes, M. J. (1999). HAP-Like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genet Biol* 27(2-3): 243-52.

Brett, C. T. (2000). Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int Rev Cytol* 199: 161-99.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., Desjardins, A. E. (2001). A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* 32(2): 121-33.

Bruins, M. B. M., Karsai, I., Schepers, J. and Snijders, C. H. A. (1993). Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to in vitro selection for *Fusarium* head blight resistance. *Plant Science* 94: 195-206.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Biologists.

Burgess, L. (1981). General ecology of the fusaria. In: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. Eds.: Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Cook, R. J., University Press, University Park, pp. 225-235.

Burgess, L. W., Backhouse, D., Swan, L. J. Esdaile, R. J. (1996). Control of *Fusarium* crown rot of wheat by late stubble burning and rotation with sorghum. *Australian Plant Pathology* 25(4): 229-233.

Capettini, F., Rasmusson, D. C., Dill-Macky, R., Schiefelbein, E. and Elakkad, A. (2003). Inheritance of resistance to *Fusarium* Head Blight in four populations of barley. *Crop Science* 43(6): 1960-1966.

Literatur

Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., Gonzalez-Verdejo, C. I., Garcia-Maceira, F. I. and Di Pietro, A. (2003). The pH signaling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 48(3): 765-779.

Carle-Urioste, J. C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A. and El-Dorry, H. (1997). Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J Biol Chem* 272(15): 10169-10174.

Carpita, N. and McCann, M. (2000). The cell wall. In: *Biochemistry and molecular biology of plants* (2002). Eds.: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L., American Society of Plant Biologists.

Carpita, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 445-476.

Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3(1): 1-30.

Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., Wilson, R. H. and McCann, M. C. (2001). Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol* 127(2): 551-65.

Carroll, A., Sweigard, J. A., Valent, B. (1994). Improved Vectors for Selecting Resistance to Hygromycin. Central Research and Development, E.I. Dupont de Nemours and Co., P.O. Box 80402, Wilmington, DE 19880-0402, USA.

CD Römpp Chemie Lexikon 9. Auflage (1995). Eds.: Falbe, J. and Regitz, M., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Chikamatsu, G., Shirai, K., Kato, M. and Kobayashi, N.T. (1999). Structure and expression properties of the endo- β -1,4-glucanase A gene from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett 175(2): 239-45.

Chow, C. M., Yague, E., Raguz, S., Wood, D. A. and Thurston, C. F. (1994). The *cel3* gene of *Agaricus bisporus* codes for a modular cellulase and is transcriptionally regulated by the carbon source. Appl Environ Microbiol 60(8): 2779-85.

Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M. and Bhat, M. K. (1996). Purification and characterisation of a major xylanase with cellulase and transferase activities from *Fusarium oxysporum*. Carbohydr Res 289: 91-104.

Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J. and Bhat, K. (1995a). Multiple forms of endo-1,4- β -D-glucanase in the extracellular cellulase system of *Fusarium oxysporum*. Biochem Soc Trans 23: 586.

Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., Claeysens, M. and Bhat, M. K. (1995b). Purification and characterization of a less randomly acting endo-1,4- β -D-glucanase from the culture filtrates of *Fusarium oxysporum*. Arch Biochem Biophys 316(1): 428-33.

Conkova, E., Laciakova, A., Kovac, G. and Seidel, H. (2003). Fusarial Toxins and their Role in Animal Diseases. The Veterinary Journal 165: 214–220.

Conlon, H., Zadra, I., Haas, H., Arst, H. N., Jones, M. G. and Caddick, M. X. (2001). The *Aspergillus nidulans* GATA transcription factor gene *areB* encodes at least three proteins and features three classes of mutation. Mol Microbiol 40(2): 361-75.

Conze, T. (2000). Molekulare Grundlagen der Pathogenität des Getreideschädling *Fusarium graminearum*: Identifizierung und Charakterisierung von pektinolytischen Enzymen. Diplomarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, AG Moerschbacher, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen.

Literatur

Conze, T. (2003). Biochemische und molekularbiologische Aspekte von Zellwandabbauenden Enzymen des phytopathogenen Pilzes *Fusarium graminearum*. Dissertation am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, AG Moerschbacher, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.

Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999). The molecular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes : an integrated approach. In: Genetics, Biochemistry and Ecology of cellulose degradation. Eds.: Ohmiya, K., Hayashi, K., Sakka, K., Kobayashi, Y., Karita, S. and Kimura, T., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23.

Cziferszky, A., Mach, R. L. and Kubicek, P. (2002). Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). J Biol Chem 277(17): 14688-14694.

Davies, G. J., Brzozowski, A. M., Dauter, M., Varrot, A., Schülein, M. (2000). Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution. Biochem J 348(Pt 1): 201-207.

De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D. and Cervonne, F. (1997). Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: The Mycota V Part A. Eds.: Carroll, G. C. and Tudzynski, P., Springer Verlag Berlin, pp. 61-83.

De Vries, R. P. (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. Appl Microbiol Biotechnol 61: 10-20.

De Vries, R. P. and Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiol Mol Biol Rev 65(4): 497-522.

De Vries, R. P., Kester, H. C., Poulsen, C. H., Benen, J. A. E. and Visser, J. (2000). Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. Carbohydr Res 327(4): 401-10.

Literatur

Desjardins, A. E., Bai, G. H., Plattner, R. D. and Proctor, R. H. (2000). Analysis of aberrant virulence of *Gibberella zeae* following transformation-mediated complementation of a trichothecene-deficient (*Tri5*) mutant. *Microbiology* 146: 2059-2068.

Desjardins, A. E., Proctor, R. H., Bai, G., McCormick, S. P., Shaner, G. Buechley, G. and Hohn, T. M. (1996). Reduced Virulence of Trichothecene-Nonproducing Mutants of *Gibberella zeae* in Wheat Field Tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(9): 775-781.

Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1991). Nuclear targeting sequences – a consensus? *TIBS* (19): 478-481.

Doohan, F. M., Brennan, J. and Cooke, B. M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 755–768.

Dowzer, C. E. A. and Kelly, J.M. (1991). Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology* 11(11): 5701-5709.

Eberhardt, R. Y., Gilbert, H. J and Hazlewood G. P. (2000). Primary sequence and enzymic properties of two modular endoglucanases, Cel5A and Cel45A, from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Microbiology* 146(Pt 8): 1999-2008.

Eder, J. (2000). Die Entwicklung der Maisanbauflächen in Bayern und in der Bundesrepublik Deutschland. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds. Schriftenreihe Bodenkultur und Pflanzenbau der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau S. 9-10.

Felenbok, B., Flippi, M. and Nikolaev, I. (2001). Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 69: 149-204.

Literatur

Foreman, P. K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N. S., Goedegebuur, F., Houfek, T. D., England, G. J., Kelley, A. S., Meerman, H. J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H. A., Teunissen, P. J. M., Yao, J. and Ward, M. (2003). Transcriptional Regulation of Biomass-degrading Enzymes in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 278(34): 31988–31997.

Gielkens, M. M., Dekkers, E., Visser, J. and De Graaf, L. H. (1999). Two Cellobiohydrolase-Encoding Genes from *Aspergillus niger* Require D-Xylose and the Xylanolytic Transcriptional Activator XlnR for Their Expression. *Applied and Environmental Microbiology* 65(10): 4340-4345.

Gilkes, N. R., Claeysens, M., Aebersold, R., Henrissat, B., Meinke, A., Morrison, H. D., Kilburn, D. G., Warren, A. J. and Miller Jr., R. C. (1991). Structural and functional relationships in two families of β -1,4-glycanases. *Eur J Biochem* 202(2): 367-77.

Gomez-Gomez, E., Ruiz-Roldan, M. C., Di Pietro, A., Roncero, M. I. and Hera, C. (2002). Role in Pathogenesis of Two Endo- β -1,4-xylanase Genes from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* 35(3): 213-22.

Grimson, M. J., Haigler, C. H., Blanton, R.L. (1996). Cellulose microfibrils, cell motility, and plasma membrane protein organization change in parallel during culmination in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Science* 109(13): 3079-3087.

Guasconi, V., Yahi, H. and Ait-Si-Ali, S. (2002). Transcription factors <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/TranscripFactorsID20043.html>

Gurr, S. A., Unkles, S. W. and Kinghorn, J. R. (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: *Gene structure in eukaryotic microbes*. Ed. Kinghorn, J. R., Oxford, IRL Press, pp. 93-139.

Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R. H. (2003). Transcription of *Clostridium cellulovorans* Cellulosomal Cellulase and Hemicellulase Genes. *Journal of Bacteriology* 185: 2520-2527.

Hatsch, D., Phalip, V., Jeltsch, J-M. (2002). Development of a bipartite method for *Fusarium* identification based on Cellobiohydrolase-C: CAPS and Western blot analysis. *FEMS Microbiology Letters* 213: 245-249.

Heijne, G. v. (1985). Signal sequences: The limits of variation. *Journal of Molecular Biology* 184: 99-105.

Heijne, G. v. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14(11): 4683-4690.

Hellweg, M. (2003). Molecular biological and biochemical studies of proteolytic enzymes of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. Dissertation am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, AG Moerschbacher, Westfälische Wilhelms Universität Münster.

Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280(Pt 2): 309-16.

Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781-788.

Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316(Pt 2): 695-6.

Henrissat, B. and Davies, G. J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* 124(4): 1515-1519.

Henrissat, B., Coutinho, P. M. and Davies, G. J. (2001). A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 47: 55–72.

Henrissat, B., Davies, G. J. (2000). Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics. *Plant Physiology* 124: 1515-1519.

Henrissat, B., Heffron, S. E. (1995). “Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily.” *Plant Physiol* 107(3): 963-76.

Henrissat, B., Teeri, T. T., Warren, R. A. (1998). A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett* 425(2): 352-354.

Henry, R. J. and Harris, P. J. (1997). Molecular Distinction between Monocotyledons and Dicotyledons: more than a simple dichotomy. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 216–218.

Hoffren, A. M., Teeri, T. T. and Teleman, O. (1995). Molecular dynamics simulation of fungal cellulose-binding domains: differences in molecular rigidity but a preserved cellulose binding surface. *Protein Engineering* 8(5): 443-450.

Hulo, N., Sigrist, C. J. A., Saux, V. L., Langendijk-Genevaux, P. S., Bordoli, L., Gattiker, A., De Castro, E., Bucher, P. and Bairoch, A. (2004). Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Research* 32: 134-137.

Idnurm, A. and Howlett, B. J. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathol* 2(4): 241-255.

Literatur

Ilmen, M., Saloheimo, A., Onnela, M-L. and Penttilä, M. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Appl Environ Microbiol 63(4): 1298-306.

Ilmen, M., Thrane, C. and Penttilä, M. (1996). The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. Mol Gen Genet 251(4): 451-60.

Invitrogen (2003). ElectroMax DH10B T1 Phage Resistant Cells. Cat. No. 12033-015

Invitrogen 1Kb DNA ladder, Cat. No. 15615-016

Iuchi, S. (2001). Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins. Cell Mol Life Sci 58(4): 625-35.

Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R. and Eichenlaub, R. (2000). The endo- β -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. Mol Plant Microbe Interact 13(7): 703-14.

Kadla, J. F. and Gilbert, R. D. (2000). Cellulose structure – A review. Cellulose Chem Technol 34: 197-216.

Kang, Z. and Buchenauer, H. (2000). Ultrastructural and Cytochemical Studies on Cellulose, Xylan and Pectin Degradation in Wheat Spikes Infected by *Fusarium culmorum*. J Phytopathol 148: 263-275.

Kimura, S. and Itoh, T. (1996). New cellulose synthesizing complexes (terminal complexes) involved in animal cellulose biosynthesis in the tunicate *Metandrocarpa uedai*. Protoplamsa 194(3-4): 151-163.

Kubicek, C. P. and Penttilä, M. E. (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*, vol 2. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.

Literatur

- Lebeda, A., Luhova, L., Sedlarova, M. and Jancova, D. (2001). The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108(1): 89-111.
- Lee, C. C., Wong, D. W. S. and Robertson, G. H. (2001). Cloning and characterization of two cellulase genes from *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol Lett* 205(2): 355-60.
- Lepschy, J. (2000). Die häufigsten Fusarientoxine in Getreide – Analytik, Toxikologie, Grenzwerte. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds. Shrifreihe Bodenkultur und Pflanzenbau der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau S. 27-32.
- Lev, S. and Horwitz, B. A. (2003). A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulase genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection. *Plant Cell* 15(4): 835-44.
- Levy, I., Shani, Z. and Shoseyov, O. (2002). Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomol Eng* 19(1): 17-30.
- Li, W. L., Faris, J. D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P. D. and Gill, B.S. (2001). Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinase and β -1,3-glucanase from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theor Appl Genet* 102: 353-362.
- Linder, M. and Teeri, T. T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology* 57: 15-28.
- Liu, J-H., Tsai, C-F., Liu, J-W., Cheng, K-J. and Cheng, C-L. (2001). The catalytic domain of a *Piromyces rhizinflata* cellulase expressed in *Escherichia coli* was stabilized by the linker peptide of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 582-589.

Literatur

Lockington, R. A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J. and Kelly, J.M. (2002). Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 37: 190–196.

Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A. and Bottalico, A. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597–609.

Luria, S.E., Adam, J.N., Teng, R.C. (1960): Transduction of lactose utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology* 12: 348-390.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. and Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3): 506-577.

Mach, R. L. and Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 515-522.

Mackenzie, L. F., Sulzenbacher, G., Divne, C., Jones, T. A., Wöldike, H. F., Schüle, M., Withers, S. G. and Davies, G. J. (1998). Crystal structure of the family 7 endoglucanase I (Cel7B) from *Humicola insolens* at 2.2 Å resolution and identification of the catalytic nucleophile by trapping of the covalent glycosyl-enzyme intermediate. *Biochem J* 335(Pt 2): 409-16.

Margolles-Clark, E., Ilmen, M. and Penttilä, M. (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology* 57: 167-179.

Marui, J., Kitamoto, N., Kato, M., Kobayashi, T. and Tsukagoshi, N. (2002). Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *FEBS Lett* 528(1-3): 279-82.

Literatur

Mastel, K. and Michels, K. (2000). Dauerbrenner Fusarium. Landinfo 9: 9-13.

McMullen, M. P. and Stack, R. W. (1999). Fusarium Head Blight (Scab) of Small Grains. www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/smgrains/pp804w.htm.

Medve, J., Karlsson, J., Lee, D. and Tjerneld, F. (1998). Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnol Bioeng* 59(5): 621-34.

Mendgen, K., Hahn, M. and Deising, H. (1996). Morphogenesis and Mechanisms of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol* 34: 367–86.

Menniti, A. M., Pancaldi, D., Maccaferri, M. and Casalini, L. (2003). Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain. *European Journal of Plant Pathology* 109: 109–115.

Mesterhazy, A. (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108: 675–684.

Munkvold, G. P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705–713.

Munoz, I. G., Ubhayasekera, W., Henriksson, H., Szabo, I., Pettersson, G., Jojansson, G., Mowbray, S. L. and Ståhlberg, J. (2001). Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. *J Mol Biol* 314(5): 1097-1111.

Murray, P. G., Collins, C. M., Grassick, A and Tuohy, M. G. (2003). Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (*cbh2*), encoding cellobiohydrolase II, from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii* and structure prediction of the gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 301(2): 280-6.

Literatur

Nakatani, F., Kawaguchi, T., Takada, G., Sumitani, J-I., Moriyama, Y. and Arai, M. (2000). Cloning and sequencing of an endoglucanase gene from *Scopulariopsis brevicaulis* TOF-1212, and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(6): 1238-46.

Nganje, W. E., Johnson, D. D. J., Wilson, W. W., Leistritz, F. L., Bangsund, D. A. and Tiapo, N. M. (2001). Economic impacts of fusarium head blight in wheat and barley: 1998-2000. *Agribusiness and Applied Economics Report* 464: 1-41.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10(1): 1-6.

Nogawa, M., Goto, M., Okada, H. and Morikawa, Y. (2001). L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet* 38(6): 329-34.

Nutt, A., Sild, V., Pettersson, G. and Johansson, G. (1998). Progress curves-a mean for functional classification of cellulases. *Eur J Biochem* 258(1): 200-206.

Nyvall, R. F., Percich, J. A. and Mirocha, C. J. (1999): Fusarium head blight of cultivated and natural wild rice (*Zizania palustris*) in Minnesota caused by *Fusarium graminearum* and associated *Fusarium* spp. *Plant Disease* 83(2): 159-164.

Obst, A. and Gammel, P. (2000). Fungizide gegen den Ährenparasiten *Fusarium graminearum*. In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds. *Schriftreihe Bodenkultur und Pflanzenbau der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau* S. 89-98.

Ochman, H., Ayala, F. J. and Hartl, D. L. (1993). Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences. *Methods Enzymol* 218: 309-321.

Literatur

Ohmiya, K., Sakka, K., Karita, S. and Kimura, T. (1997). Structure of cellulases and their applications. *Biotechnology and Genetic Engineering reviews* 14: 365-414.

O'Sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4: 173-207.

Parry, D. W., Jenkinson, P. and McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant pathology* 44: 207-238.

Patey, A. L. and Gilbert, J. (1989). Fate of *Fusarium* mycotoxins in cereals during food processing and methods for their detoxification. In: *Topics in Secondary Metabolism – Volume 2: Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Ed.: Chelkowski, J., Elsevier Science Publishers B.V.

Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C. and Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 731–742.

Pontecorvo, G. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141–238.

Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A. and Vance, C. P. (2000). Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(2): 159-169.

Proctor, R. H., Desjardins, A. E., McCormick, S. P., Plattner, R. D., Alexander, N. J. and Brown, D. W. (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 691–698.

Proctor, R. H., Hohn, T. M. and McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact* 8(4): 593-601.

Literatur

Proctor, R. H., Hohn, T. M. and McCormick, S. P. (1997). Restoration of wild-type virulence to *Tri5* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology* 143(Pt 8): 2583-91.

Rabinovich, M. L., Melnik, M. S. and Bolobova, A. V. (2002). Microbial cellulases (Review). *Appl Biochem and Microbiol* 38(4): 305-321.

Receveur, V., Czjzek, M., Schülein, M., Panine, P. and Henrissat, B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of a two domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *J Biol Chem* 277(43): 40887-92.

Reid, L. M. and Sinha, R. C. (1998). Maize maturity and the development of gibberella ear rot symptoms and deoxynivalenol after inoculation. *European Journal of Plant Pathology* 104: 147–154.

Rintelen, J. (2000). Ist das starke Auftreten von *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) an Getreideähren auf die Zunahme des Maisanbaus zurückzuführen? In: Risiken durch den Ährenparasiten *Fusarium graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds. Shriftreihe Bodenkultur und Pflanzenbau der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau S. 11-14.

Rollins, J. A. (2003). The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (9): 785-795.

Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Genet* 11(1): 12-17.

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K. C. and Jones, T. A. (1990). Three-Dimensional structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science* 249: 380-385.

Royer, J. C., Moyer, D. L., Reiwitch, S. G., Madden, M. S., Jensen, E. B., Brown, S. H., Yonker, C. C., Johnstone, J. A., Golightly, E. J., Yoder, W. T. and Shuster, J. R. (1995). *Fusarium graminearum* A 3/5 as a novel host for heterologous protein production. *Biotechnology* 13(13): 1479-1483.

Ruiz-Roldan, M. C., Di Pietro, A., Huertas-Gonzalez, M. D., Roncero, M. I. G. (1999). Two xylanase genes of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* are differentially expressed during infection of tomato plants. *Mol Gen Genet* 261: 530-536.

Sachs, M. S. and Yanofsky, C. (1991). Developmental expression of genes involved in conidiation and amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Dev Biol* 148(1): 117-28.

Saloheimo, A., Aro, N., Ilmen, M. and Penttilä, M. (2000). Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 275(8): 5817-25.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sandgren, M., Shaw, A., Ropp, T. H., Wu, S., Bott, R., Cameron, A. D., Ståhlberg, J., Mitchinson, C. and Jones, T. A. (2001). The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 308(2): 295-310.

Schisler, D. A., Khan, N. I. and Boehm, M. J. (2002). Biological control of Fusarium head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists. *Adv Exp Med Biol* 504: 53-69.

Schmoll, M. and Kubicek, C. P. (2003). Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50(2-3): 125-145.

- Schülein, M. (1997). Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *J Biotechnol* 57(1-3): 71-81.
- Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Cervone, F. and Walton D (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *The Plant Cell* 2: 1191-1200.
- Seiboth, B., Hakola, S., Mach, R. L., Suominen, P. L., Kubicek, C. P. (1997). Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J Bacteriol* 179(17): 5318-5320.
- Sexton, A. C., Paulsen, M., Woestemeyer, J. and Howlett B. J. (2000). Cloning, characterization and chromosomal location of three genes encoding host-cell-wall-degrading enzymes in *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica* spp. *Gene* 248(1-2): 89-97.
- Sheppard, P. O., Grant, F. J., Oort, P. J., Sprecher, C. A., Foster, D. C., Hagen, F. S., Upshall, A., McKnight, G. L. and O'Hara, P. J. (1994). The use of conserved cellulase family-specific sequences to clone cellulase homologue cDNAs from *Fusarium oxysporum*. *Gene* 150: 163-167.
- Sims, P. F. G., Soares-Felipe, M. S., Wang, Q., Gent, M- E., Tempelaars, C. and Broda, P. (1994). Differential expression of multiple exo-cellobiohydrolase I-like genes in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol. Microbiol.* 12:209–216.
- Southwell, R. J., Moore, K. J., Manning, W., Hayman, P. T. (2003). An outbreak of *Fusarium* head blight of durum wheat on the Liverpool Plains in northern New South Wales in 1999. *Australasian Plant Pathology* 32(4): 465-471.
- Sposato, P., Ahn, J-H. and Walton, J. D. (1995). Characterization and disruption of a gene in the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* encoding a cellulase lacking a cellulose binding domain and hinge region. *Mol Plant Microbe Interact* 8(4): 602-609.

Literatur

- Srisodsuk, M., Reinikainen, T., Penttila, M., Teeri, T. T. (1993). Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J Biol Chem* 268(28): 20756-20761.
- Stack, R. W., Elias, E. M., Fetch, J. M., Miller, J. D. and Joppa, L. R. (2002). Fusarium Head Blight Reaction of Langdon Durum-*Triticum dicoccoides* Chromosome Substitution Lines. *Crop Sci* 42:637–642.
- Stålbrand H., Mansfield S. D., Saddler, J. N., Kilburn, D. G., Warren, R. A. J. and Gilkes, N. R. (1998). Analysis of Molecular Size Distributions of Cellulose Molecules during Hydrolysis of Cellulose by Recombinant *Cellulomonas fimi* β -1,4-Glucanases. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (7): 2374-2379.
- Stoger, E., Williams, S., Keen, D. and Christou, P. (1999). Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. *Transgenic Research* 8: 73–82.
- Sulzenbacher, G., Schülein, M. and Davies, G. J. (1997). Structure of the Endoglucanase I from *Fusarium oxysporum*: Native, Cellobiose and 3,4-Epoxybutyl β -D-Cellobioside-Inhibited Forms, at 2.3 Å Resolution. *Biochemistry* 36: 5902-5911.
- Suto, M. and Tomita, F. (2001): Induction of catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Bioscience Bioengineering* 92(4): 305 – 311.
- Sutton, J. C. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209.
- Sweeney, M. J. and Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol* 43(3): 141-58.
- Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. and Uozumi, T. (1998b). Isolation of the gene and characterization of the enzymatic properties of a major exoglucanase of *Humicola grisea* without a cellulose-binding domain. *J Biochem* 124(4): 717-25.

Literatur

Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., Uozumi, T. (1999). Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. *J Biotechnol* 67(2-3): 85-97.

Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Masaki, H. and Uozumi, T. (1996a). Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei cbh1* upstream region. *FEMS Microbiol Lett* 145(3): 361-6.

Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T. (1996b). Cloning, sequencing and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Journal of Biotechnology* 50: 137-147.

Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. and Uozumi, T. (1998a). Isolation of the *creA* Gene from the Cellulolytic Fungus *Humicola grisea* and Analysis of CreA Binding Sites Upstream from the Cellulase Genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(12): 2364-2370.

Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech* 15: 160-167.

Teeri, T. T., Lehtovaara, P., Kauppinen, S., Salovuori, I. and Knowles, J. (1987). Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* 51(1): 43-52.

Todd, R. B. and Andrianopoulos, A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* 21(3): 388-405.

Tomczak, M., Wisniewska, H., Stepień, L., Kostecki, M., Chelkowski, J. and Golinski, P. (2002). Deoxynivalenol, nivalenol and moniliformin in wheat samples with head blight (scab) symptoms in Poland (1998–2000). *European Journal of Plant Pathology* 108: 625–630.

Literatur

Tomme, P., Driver, D. P., Amandoron, E. A., Miller R. C., Antony, R., Warren, J. and Kilburn, D. G. (1995). Comparison of a Fungal (Family I) and Bacterial (Family II) Cellulose-Binding Domain. *Journal of Bacteriology* 177(15): 4356–4363.

Triglia, T. (2000). Inverse PCR (IPCR) for obtaining promoter sequence. In: *Methods in Molecular Biology* Vol. 130. Ed.: Tymms, M. J., Humana Press Inc., Totowa, pp. 79-83.

Triglia, T., Peterson, M. G., Kemp, D. J. (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Research* 16(16): 8186.

Tudzynski, B., Liu, S. and Kelly, J. M. (2000). Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea creA* genes. *FEMS Microbiol Lett* 184(1): 9-15.

Urbanek, H. (1989). The role of cutinase and cell wall degrading enzymes produced by *Fusaria* in pathogenesis. In: *Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Ed: Chelkowski, J., Elsevier Science Publishers B.V.

Vallim, M. A., Janse, B. J. H., Gaskell, J., Pizzirani-Kleiner, A. A. and Cullen, D. (1998). *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood. *Appl Environ Microbiol* 64(5): 1924-1928.

van Peij, N. N. M. E., Gielkens, M. M., de Vries, R. P., Visser, J. and De Graaf, L. H. (1998b). The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* 64(10): 3615-3619.

van Peij, N. N. M. E., Visser, J. and De Graaf, L. (1998a). Isolation and analysis of *xlnR*, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol* 27(1): 131-42.

Literatur

Varrot, A., Hastrup, S., Schülein, M. and Davies, J. (1999b). Crystal structure of the catalytic core domain of the family 6 cellobiohydrolase II, Cel6A, from *Humicola insolens*, at 1.92 Å resolution. *Biochem J* 337(Pt 2): 297-304.

Varrot, A., Schülein, M. and Davies, G. J. (1999a). Structural changes of the active site tunnel of *Humicola insolens* cellobiohydrolase, Cel6A, upon oligosaccharide binding. *Biochemistry* 38(28): 8884-8891.

Vautard-Mey, G., Cotoon, P. and Fevre, M. (1999). Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Biochem* 266, 252-259.

Vesonder, R. F. and Golinski, P. (1989). Metabolites of *Fusarium*. In: Topics in Secondary Metabolism – Volume 2: *Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. Ed.: Chelkowski, J., Elsevier Science Publishers B.V.

Wang, H. and Jones, R. W. (1995). Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Gene* 158(1): 125-128.

Wanjiru, W. A., Zhensheng, K. and Buchenauer, H. (2002). Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology* 108: 803–810.

Ward, D. E., Ross, R. P., van der Weijden, C. C., Snoep, J. L. and Claiborne, A. (1999). Catabolism of Branched-Chain α -Keto Acids in *Enterococcus faecalis*: the *bkd* Gene Cluster, Enzymes, and Metabolic Route. *Journal of Bacteriology* 181(17): 5433–5442.

Watanabe, H. and Tokuda, G. (2001). Animal cellulases. *Cell Mol Life Sci* 58: 1167–1178.

Literatur

Wiethölter, N., Graebner, B., Mierau, M., Willats, W. G. T., Knox, J. P. and Moerschbacher, B. M. (2003). Isolation and characterisation of the homogalacturonan from type II cell walls of the commelinoid monocot wheat using HF-solvolysis. *Carbohydr Res* 338: 423-431.

Wolfe, S. A., Nekludova, L. and Pabo, C. O. (1999). DNA recognition by Cys₂His₂ zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 183-212.

Wood, T. M. (1992). Fungal cellulases. *Biochemical Society Transactions* 20(1): 46-53.

Wu, S. C., Ham, K. S., Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1997). Deletion of two endo-beta-1,4-xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(6): 700-708.

Wymelenberg, A. V., Denman, S., Dietrich, D., Bassett, J., Yu, X., Atalla, R., Prdki, P., Rudsander, U., Teeri, T. T. and Cullen, D. (2002). Transcript analysis of genes encoding a family 61 endoglucanase and a putative membrane-anchored family 9 glycosyl hydrolase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 68(11): 5765-5768.

Xu, X. (2003). Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology* 109: 683-689.

Yague, E., Mehak-Zunic, M., Morgan, L., Wood, D. A. and Thurston, C. F. (1997). Expression of CEL2 and CEL4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and β -mannanase, respectively, is regulated by the carbon source. *Microbiology* 143(Pt 1): 239-244.

Zeilinger, S., Ebner, A., Marostis, T., Mach, R. and Kubicek, C. P. (2001). The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Mol Genet Genomics* 266(1): 56-63.

Literatur

Zeilinger, S., Mach, R. L. and Kubicek, P. (1998). Two adjacent protein binding motifs in the *cbh2* (cellobiohydrolase II-encoding) promoter of the fungus *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cooperate in the induction by cellulose. *J Biol Chem* 273(51): 34463-34471.

Zou, J. Y., Kleywegt, G. J., Stahlberg, J., Driguez, H., Nerinckx, W., Claeysens, M., Koivula, A., Teerii, T. T., Jones, T. A. (1999): Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*. *Structure With Foldinmg & Design* 7(9): 1035-1045.

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	Ammoniumheptamolybdat
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
3D	3 Dimensional
A	Adenin (bei Nukleinsäuren)
A	Alanin (bei Proteinen)
A. bidest	bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
<i>ace</i> / ACE	Activator of Cellulase Expression (Gen / Protein)
Asp	Asparaginsäure
B	C oder G oder T (bei Nukleinsäuren)
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein (bei Proteinen)
C	Cytosin (bei Nukleinsäuren)
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBD	Cellulose binding domain
<i>cbh</i> / CBH	Cellobiohydrolase (Gen / Protein)
CBM	Carbohydrate binding module
cDNA	komplementäre DNA
<i>cel</i> / CEL	Cellulase (Gen / Protein)
CM	Complete Medium
cm	Zentimeter
<i>cre</i> / CRE	Catabolite Repressor (Gen / Protein)
CuSO ₄	Kupfersulfat
Cys	Cystein
d	Tag(e)
D	Asparaginsäure (bei Proteinen)
D	G oder A oder T (bei Nukleinsäuren)
DNA	Deoxyribonucleic acids
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DON	Deoxynivalenol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>egl</i> / EGL	Endoglucanase (Gen / Protein)
<i>et al.</i>	et alii
etc.	et cetera
<i>exo</i> / EXO	Exocellulase (Gen / Protein)
F	Phenylalanin
FEB	Fusarium ear blight
FeSO ₄	Eisensulfat
FHB	Fusarium head blight
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin (bei Nukleinsäuren)
G	Glycin (bei Proteinen)
g	Gramm (bei Gewichtsangaben)
GAX	Glucuronoarabinoxylane
GH	Glycoside Hydrolase

Abkürzungsverzeichnis

Gluc	Glucosidase
H	Histidin (bei Proteinen)
h	Stunde(n)
H	A oder C oder T (bei Nukleinsäuren)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HIV	human immunodeficiency virus
Hpt	Hygromycinphosphotransferase
I	Isoleucin
K	Lysin (bei Proteinen)
K	G oder T (bei Nukleinsäuren)
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria-Bertai
M	Methionin (bei Proteinen)
M	molar
M	C oder A (bei Nukleinsäuren)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mmol	Millimol
MnSO ₄	Mangansulfat
mol	Mol
mRNA	messenger ribonucleic acids
N	Asparagin (bei Proteinen)
N	A oder T oder C oder G (bei Nukleinsäuren)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
nm	Nanometer
P	Prolin
p.i.	nach der Inokulation
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Picomol
Q	Glutamin
R	Arginin (bei Proteinen)
R	A oder G (bei Nukleinsäuren)
RNA	Ribonucleic acids
rpm	rotations per minute

Abkürzungsverzeichnis

RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Serin (bei Proteinen)
S	C oder G (bei Nukleinsäuren)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SPTC	Sorbitol-PEG-Tris-CaCl ₂
STC	Sorbitol-Tris-CaCl ₂
T	Threonin (bei Proteinen)
T	Thymidin (bei DNA)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetic acid-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultra Violett
V	Valin (bei Proteinen)
V	Volt
V	A oder C oder G (bei Nukleinsäuren)
v/v	Volumen pro Volumen
W	Tryptophan (bei Proteinen)
W	A oder T (bei Nukleinsäuren)
w/v	Gewicht pro Volumen
<i>xlnr</i> / XlnR	Xylanase Regulatory Protein (Gen / Protein)
XyG	Xyloglucane
<i>xyn</i> / XYN	Xylanase (Gen / Protein)
Y	Tyrosin (bei Proteinen)
Y	C oder T (bei Nukleinsäuren)
ZnSO ₄	Zinksulfat
ZW	Zellwand
Ω	Ohm

Tab. A.1: Verwendete Primer mit Sequenz. Bei PCRs verwendete Annealingtemperaturen sind Tab. A.2 zu entnehmen.

Primer	Sequenz
<i>cel6</i>	
cel6uni1	TGTGGTGGCCAGAA (CT) TGG
cel6rev1	GGCTTGACCCAGACC (AG) AA
cel6inv1	TGGTGCAGCAAGGAGTGCCGCTCCAGTTCT
cel6inv2	CACTGGCGATGCCCTCGTCGACGCTTCGGT
cel6inv3	CAACAGGAGCTGCGAGAGCAGTGGCTGCAA
cel6inv4	TGCCAACACTGGCGATGCCCTCGTCGACGC
cel6uni2	ATGACGGCCTACAAGCTTTT
cel6rev2	TTACAGGAAAGAGGGGTTGG
cel6uni3	TAACATGGTCACGAACATGA
cel6rev3	TCATGTTTCGTGACCATGTTA
<i>cel7A</i>	
cel7uni1	CTGG (AC) TACTGTGATGC (CT) CAGTTGC
cel7rev1	ATGACCTTG (CT) (CT) GT (CT) CTGGA (CT) GTA
cel7auni1	ATCTGGGAGGCCAACTCC
cel7arev1	TTACTGACACTGGGAGTAGA
cel7auni2	CCAACTGGCG (AC) TGGACTCACCCAG
cel7ainv1	GCCGGTGTAGCAGTTGGTAGATCCCGACAC
cel7ainv2	CTGGCTTCACCTGCAAGAAGATCAACGACT
cel7arev2	TGTCCCAAGTTACCAATACCACCGTTAACA
cel7auni3	ATGTATCGCGCCATCGCCACCGCCTCGGCG
cel7arev3	TTACTGACACTGGGAGTAGAAGTCGTTGAT
<i>cel7B</i>	
cel7uni1	CTGG (AC) TACTGTGATGC (CT) CAGTTGC
cel7rev1	ATGACCTTG (CT) (CT) GT (CT) CTGGA (CT) GTA
cel7binv1	CCCACTCCGTTGATGAAAGGTGTGACATAG
cel7binv2	AGTGGCAAGCTCACAGAGATGCACCGCCAC
cel7buni1	ACTCATAGCTCCTGCCAAC
cel7brev1	CGATGGATCCAAGTGGGACT
cel7brev2	TGCGTCGGCGACGATGTAGTTTGTGCGCCTT
cel7buni2	TCGAGACATAACCGATGCACAAAGGCAAAGG
<i>cel45</i>	
cel45uni1	TACTGGGACTGCTGCAAGCCTTC
cel45rev1	TCGGCGTTCT (CT) GAACCAGTCGAA
cel45inv1	GTCACAAGTCAAAGCAGGGCGCTGACTTT
cel45inv2	TTTCCCCGAGCTGCTCAAGGATGGTTGCCA
cel45rev2	TTAGTTGGGAACACACTGAGAGTAGTAATC
cel45uni2	TTCAAACCAAGCAATCTTTTGCCACCATGC

Primer	Sequenz
<i>ace1</i>	
ace1uni1	TCCATGGCCCG (CT) CG (GC) AAGAAGAA
ace1rev1	TCCATGTG (CT) TGCTTGCAGTT
ace1uni2	TCTTGAGAAAACCCTGATCTTTATGGCACC
ace1rev2	AGGCCACCGACGAGCTTGATCTCATCAGAT
ace1uni3	TAATGGCGTTTGGGAAAATACTTATCGGAC
ace1rev3	GGCAAGTTAGTTGCGTGGTTCAAGGGAACG
ace1uni4	CCTATCGTCGATCCCAAGAT
ace1rev4	TTCTTTTGTGCATCTTGGGATCGACGATAGG
ace1rev5	GTCGCTAAGATATTCGACTG
ace1uni5	ACTCGTCGTTTGGACGTAGCTCATCGTGTG
ace1inv1	CTCGTTTAAACCGTGCCCCTACAAGTGAAA
ace1inv2	ACGGCATTTCTTGGGGGCCAGTTCCTCGGG
ace1inv3	GGGTAGAGCTGTTCTTAAAAGACAAGGCAT
ace1inv4	TGATTATGACTTCCTCTGGCGGTAGATTGA
ace1inv5	TTATCCTGGACAACGAAGACCTCTACGCTG
ace1inv6	GGCGGAACAGGGCAACTATAATATGAGTT
ace1inv7	ATGTCCTTCTNCCACCCTCGTCGAAGGACT
ace1bamh1uni	AGAGGATCCATGTCCTTCTCCCACCCTCGTCGAAGG
ace1pst1rev	AGACTGCAGTTACCTAGTCAAAGGTTTGCAGAAAT
ace1rev6	TTACCTAGTCAAAGGTTTGC
ace1uni6	CACACGCCCTGACTGCGGAATTGTGCACCC
sonstige	
M13uni	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13rev	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
hygrouni	ATGAAAAAGCCTGAACT
hygrorev	CCGAGGGCAAAGGAATAG
OligodT	TTTTTTTTTTTTTTTTTNV

Tab. A.2: Bei PCRs verwendete Primerkombinationen mit Annealingtemperaturen (Primersequenzen s. Tab. A.1). Bei inverser PCR verwendete Verdauere bzw. Ligationen sind in Klammern angegeben (Kapitel 2.3.3).

Primer	Annealingtemperatur in °C
<i>cel6</i>	
cel6uni1+cel6rev1	53
cel6inv1+ cel6inv2 (<i>HindIII</i>)	50
cel6inv3+ cel6inv4 (<i>BglII</i>)	60
cel6uni2+cel6rev2	50
cel6uni2+cel6rev3	50
cel6inv2+cel6rev2	50
cel6uni3+cel6rev2	50
<i>cel7A</i>	
cel7uni1+cel7rev1	50
cel7auni1+cel7arev1	50
cel7auni2+cel7rev1	50
cel7ainv1+cel7ainv2 (<i>BglIII</i>)	60
cel7auni3+cel7arev2	50
cel7auni1+cel7arev3	50
<i>cel7B</i>	
cel7binv1+cel7binv2 (MIP-2)	60
cel7buni1+cel7brev2	54
cel7binv2+cel7brev1	54
cel7uni1+cel7rev1	50
cel7buni2+cel7binv1	60
<i>cel45</i>	
cel45uni1+cel45rev1	60
cel45inv1+cel45inv2 (<i>NcoI</i>)	63
cel45inv2+cel45rev2	60
cel45uni2+cel45rev1	55
<i>ace1</i>	
ace1uni1+ace1rev1	50
ace1uni2+ace1rev2	50
ace1uni2+ace1rev3	60
ace1uni3+ace1rev2	60
ace1uni5+ace1rev4	60
ace1uni5+ace1rev5	50
ace1uni5+ace1rev2	60
ace1uni4+ace1rev2	50
ace1inv1+ace1inv2 (<i>XhoI</i>)	55
ace1inv1+ace1rev4 (<i>NcoI</i>)	60
ace1inv1+ace1inv3 (<i>ClaI</i>)	65
ace1uni4+ace1inv3 (<i>EcoRI</i>)	60
ace1inv4+ace1inv7 (<i>EcoRI</i>)	60

Primer	Annealingtemperatur in °C
ace1inv7+ace1inv6 (MIP-1)	60
ace1rev4+ace1inv5 (<i>Nco</i> I)	60
ace1inv2+ace1inv5 (<i>Hind</i> III)	60
ace1rev5+ace1inv5 (<i>Eco</i> RI)	50
M13uni+ace1rev4	50
M13rev+ace1uni4	50
M13rev+ace1uni5	50
M13uni+M13rev	50
hygrouni+hygrorev	50
ace1uni4+ace1rev1	50
ace1inv7+ace1rev5	50
ace1uni1+ace1rev6	50
ace1uni5+ace1inv3	60
ace1uni6+ace1inv3	60

ATGTATCGCGCCATCGCCACCGCCTCGGGCGCTCATCGCAGCCGTTTCGGGCTCAGCAAGTTTGCTCTCTCACACAGGAGAGCAAGCCCTCCCTGAACTGGTCCAAGTGATACATCCAGCGGATGCAGCAACGTCAAGGATCCGTCACCATCGATGCCAACTGGCGATGGACTCACCAAGTGTCGGATCTACCAACTGCTACACCGCAACAAGTGGGACACTTCCGTCTGCACCAGCGGAAAGGTCTGTGCTGAGAGGTGCTGTCTCGACGGCGCCGACTACGCCAGCACCTACGGTATCACCTCCAGCGGCGACCAGCTCAGCCTCTCGTTTCGTCACCAAGGGACCTTACAGCACCAACATCGGTAGCCGTACTTACCTCATGGAGGACGAGAACACCTACCAGATGTTCCAGCTCCTGGGTAACGAGTTCACCTTTGATGTCGATGTTTCAAACATTTGGATGTGGTCTGAACGGTGCTCTTTACTTTCGTCAGCATGGACGCCGATGGTGGCAAGGCCAAGTACCCCGGTAACAAGGCTGGAGCCAAGTACGGTACTGGTTACTGTGATGCCAGTGCCTTCGTGACGTTAAGTTCATCAACGGCCAGGTAAGCTTCAAACACATTTTTAACTCAGGATGAACGCTAACATGCAGTGAAGGCCAACTCTGATGGCTGGCAGCCCTCCGACAGCGATGTCAACGGTGGTATTGGTAACTTGGGCACATGCTGCCCTGAGATGGACATCTGGGAGGCCAACTCCATCTCCACTGCCTACACTCCTCACCTTGCACCAAGCTCACTCAGCACTCTTGCACTGGCGACTCTTGCGGTGGAACCTACTCCAACGACCGTTACGGCGGAACCTGCGATGCTGACGGTTGCGATTTCAACTCCTACCGCCAGGGCAACAAGACCTTCTACGGTCTGGATCTGGCTTCAACGTTGACACCACTAAGAAGGTCACCGTCGTCACTCAGTTCACAAGGGCAGCAACGGACGTCCTCTGAGATCACCCGTCTCTATGTCCAGAATGGCAAGGTCATTGCCAACTCTGAGTCCAAGATTGCTGGAGTTCCTGGAACTCTCTTACCGCTGACTTCTGCACCAAGCAGAAGAAGGTCCTTAAACGACCCCGATGACTTCACGAAGAAGGTGCTTGGAGCGGTATGAGCGATGCTCTTGAGGCTCCCATGGTTCCTTGTATATGCTCTCTGGCAGACGTGAGTATTACCGAATTCCAAATTCATTGCATAGTATGATATACTGACTAATACACAGCACCACGCCAATGCTCTGGCTCGACTCTACCTACCCCACTGACTCTACCAAGCTCGGCTCTCAGCGCGGATCTTGCTCTACATCCTCTGGCGTGCCTGCCGACCTTGAGAAGAACGTCCCCAACTCCAAGGTTGCCCTTCTCCAACATCAAGTTCGGTCCCATCGGCAGCACCTACAAGAGCGACGGCACCCTCCACCAACCCACC AACCTTCTGAGCCCAGCAACACTGCCAACCCCAACCCCGGCACCGTTGACCAGTGGGGCCAGTGCGGTGGCAGCAACTACAGCGGTCCTACCGCCTGCAAGTCTGGCTTACCTGCAAGAAGATCAACGACTTCTACTCCAGTGCCAG**TAA**

Abb. A.1: Nukleotidsequenz (1649 bp) des *cel7A*-Gens aus *F. graminearum*. Introns sind grau hinterlegt, Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Intronpositionen: Intron 1: 610-661, Intron 2: 1229-1286. Die Nukleotidsequenz ist in der GenBank Datenbank unter der Nummer AY342396 hinterlegt.

MYRAIATASALIAAVRAQQVCSLTQESKPSLNWSKCTSSGCSNVKGSVTIDANNRWTHQVSGSTNCYT
GNKWDTSVCTSGKVCAERCCLDGADYASTYGITSSGDQLSLSFVTKGPYSTNIGSRTYLMEDENTYQM
FQLLGNEFTFDVDVSNIGCGLNGALYFVSMADGGKAKYPGNKAGAKYGTGYCDAQCPRDVKFINGQA
NSDQWQPSDSVDVNGGIGNLGTCCPEMDIWEANSISTAYTPHPCTKLTQHSCCTGDS CGGTYSNDRYGGT
CDADGCDFNYSYRQGNKTFYGPSSGFNVDTTKKVTVVTFHKGSNGLRLSEITRLYVQNGKVIANSESKI
AGVPGNSLTADFCTKQKKVFNDPDDFTKKGAWSGMSDALEAPMVLVMSLWHDHHSNMLWLDSTYPTDS
TKLGSQRGSCSTSSGVPADLEKNVPNSKVAFSNIKFGPIGSTYKSDGTTPTNPTNPSEPSNTANPNP
TVDQWGQCGGSNYSGPTACKSGFTCKKINDFYSCQ

Abb. A.2: Proteinsequenz (512 Aminosäuren) der Cel7A. Die grau hinterlegten Bereiche sind das Signalpeptid (Aminosäuren 1-17), die katalytische Domäne (Aminosäuren 19-453) und das CBM (Aminosäuren 480-512). Das 26 Aminosäuren lange Linkerpeptid ist hervorgehoben, die Prolin- (P), Serin- (S) und Threoninreste (T) sind unterstrichen.

ATCAAGTTCTTTCTCTCTCTCAACTCTCCTGGCCAACACGGTCGTGGGCCAGACTCCTGACAA
GACCCAGGAGAAGCACCCCAAGATCGAGACATACCGATGCACAAAGGCAAAGGGCTGCAAGAAGGCGA
CAAACACTACATCGTCGCCGACGACAGACTTACCGGCATCAGCCAGGCCAACGGCCAGAGCTGCGGTAACT
TGGGGTGAAGCCGCCAACTCCACTGCTTGCCCCGACAAGGCAACATGTGCCAAGAACTGCAAGCTCTT
TGGCATGAACGAGGCTGCGTACAAGGCCAAGGGTATCAGCACCTCTGGTAACTGCTCTCCGTCTGGAGA
TGCTGCGCAACGGCCAGTCTGTTTCTCCCCGTGTTTACCTCCTCGAGGAGAAACAAGAACAGTATGAG
ATGCTCAAGCTTACCGGTGCTGAGTTCTTTTCGATGTTGAGACTCAGAAGCTTCCCTTGTGGTATGAA
CGGTGCTCTGTATCTTTCTGGGATGCCTGCCGATGGTGGAAAGAGCACGAGCAAGTACAGCAAGGTTG
GTGCTGCTCAGGGTGGCGGATACTGTGATGCTCAGTGCTATGTCACACCTTTCATCAACGGAGTGGTA
AGTTTATCCTGAAAGTCTTGTAAATAACCTCAACTGACATAGTTTTTAGGGTAACATCAAGGGCAAGG
GTGTCTGTTGTAACGAGATGGATATCTGGGAGGCCAACTCTCGCGCCACCCACATGCTCCTCACCCC
TGCAGTGTCCCCGGCCTTTACGGCTGCACAGGTGCCGAATGCCAGAAGGATGGTATCTGTGACAAGGC
TGGCTGCGGCTGGAACCATAAACCACAACGGCGTTCTGATTTTTTACGGACGCGGCAAGAACTTCAAGG
TCGACACGACCCGCAAGTTCACAGTTGTCTCGTCAATCCCCCGGACAAGAGTGGCAAGCTCACAGAG
ATGCACCGCCACTACATCCAGAACAAACAAGGTGATGATCAAGAGCGCCGTCGTCAACCTCCCCGGACC
CCCCAAGGTTACCGGTAACATCATCACCGACAACACTACTGCAAGGCCTCGCACGCAGACGACTACATCC
GTCTCGGCGGCACAGAGGAGATGGGCGATGCCATGACCCGTGGTATGGTTCTCGCCATGAGTGTCTGG
TGGAGCGAGGGCGACTCCATGGAGTGGCTCGACGGACAGGGTGTGGCGCTGGACCTGCACCAAGGA
GGAGGGCCTCCCTAAGAACATTGTCAAGGTGCGACCCCAACCTGAGGTTACGTTTAGCAACATCCGCA
TTGGCGAGATCGGGTGCACACACGGGTGAAGATGCCTCGCGTGTATGGCGCTCACCGCCTGTAA

Abb. A.3: Nukleotidsequenz (1357 bp) des *cel7B*-Gens aus *F. graminearum*. Das Intron ist grau hinterlegt, Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Intronposition: 610-661.

MKFFPLLLSTLLANTVVVGQTPDKTQEKHPKIEYRCTKAKGCKKATNYIVADAEHLHGISQANGQSCGN
WGEAANSTACPDKATCAKNCKLFGMNEAAYKAKGISTSGNALRLEMLRNGQSVSPRVYLLEENKNKYE
MLKLTGAEFSFDVETQKLPCGMNGALYLSGMPADGGKSTSKYSKVGAAQGGGYCDAQCYVTPFINGVG
NIKKGKVVCCNEMDIWEANSRATHIAPHPCSVPLYGCTGAECQKDGICDKAGCGWNHNRNGVPDFYGR
GKNFKVDTRKFTVVSSFPADKSGKLEMHHRHYIQNNKVMIKSAVVTLPGPPKVTGNIITDNYCKASH
ADDYIRLGGTEEMGDAMTRGMVLA MSVWVWSEGDSMEWLDGQGAGAGPCTKEEGLPKNIIVKVEPNPEVT
FSNIRIGEIGSTHAVKMPRVYGAHRL

Abb. A.4: Proteinsequenz (434 Aminosäuren) der Cel7B. Die grau hinterlegten Bereiche sind das Signalpeptid (Aminosäuren 1-18) und die katalytische Domäne (Aminosäuren 20-423).

ATGCGTTCTTTTCGCTCTCCTCGCCCTGTTTCGGCCCTCTCGCCGTGAGTGCTGCTTCTGGAAGTGGTCA
CTCTACTCGATACTGGGACTGCTGCAAGCCTTCTTGCTCTTGGAGTGGCAAGGCCAAAGTCAGCGCCC
CTGCTTTTGACCTGTGACAAAAAGACAACCCCATCACTAACCTGAACGCCGTCAACGGTTGTGAGAGT
GGTGGTTCTGCCTTTGCTTGTACTAACTACTCCCTTGGGCTGTCAACGACGACCTTGCTTACGGTTT
CACTGCTACCAAGCTTGCTGGTGGCACTGAGGCCAGCTGGTGTGTGCTTGCTATGCGTATGTCTCGA
TTACTCAAATCAATCTTTACAGCTCTTCGTGCTAACTGTCTCTCCAAGTCTCACTTTCACGACCGGTC
CCGTAAAGGGAAAGAAGATGATTGTCCAGTCCACCAACTGGTGGTGTATCTCGGTGATAACCACTTC
GACCTTATGATGCCCCGGGCGGTGGTGTCCGTATATTCGATGGATGCACCTCTGAGTTCGGCAAGCCCCCT
CGGTGGTGTCTCAGTACGGCGGCATCTCTTCCCGAAGCCAATGTGACAGTTTCCCCGAGCTGCTCAAGG
ATGGTTGCCACTGGCGATTTGACTGGTTCAAGAACGCCGACAACCCAGACTTCACTTTCGAGCAGGTC
CAGTGCCCCAAGGAGCTCCTCGCCATTAGCGGCTGCAAGCGTGACGACGACTCTAGCTTCCCTGCCTT
CAAGGGCAACACCACTCCCAGCAATGCTAAGCCAGTGGTGAGAAAGAGTGCTGCCGAGCCCAGCCCTC
AGAAGCCCTCTACCAAGGCTGCTACTGAGCCATTGCTACTAAGCCTGCTACCGTCAAGCCTGCTCCT
GTCAAGCCCACCAAGGTTGTCAACAAGCCCAAGACCGCTTCAAAGGTTGGTGGAACCAAGACTCGAGG
AAAATGCCCCGCCACTAAGCCTACCAAGCCTGCCGCCCTCAGAAGTCTGCTGTGCTATTTACCACC
AATGTGGTGGTTCCAAGTCTGCCTACCCCGATGGCAGCCTCAGTTGCGCTTCCGGAAGCAAGTGTGTGTC
AAGATGAACGATTACTACTCTCAGTGTGTTCCCAACT**TAA**

Abb. A.5: Nukleotidsequenz (1127 bp) des *cel45*-Gens aus *F. graminearum*. Das Intron ist grau hinterlegt, Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Intronposition: 330-388. Die Nukleotidsequenz ist in der GenBank Datenbank unter der Nummer AY342397 hinterlegt.

MRSFALLALFGPLAVSAASGSGHSTRYWDCKPSCSWSGKAKVSAPALTCDDKKNPIITNLNAVNGCES
GGSAFACTNYSWPVAVNDDLAYGFTATKLAGGTEASWCCACYALFTTGPVKGKKMIVQSTNTGGDLGD
NHFDLMMPPGGGVGIFDGCTSEFGKPLGGAQYGGISSRSQCDSFPELLKDGCHWRFDWFKNADNPDTF
EQVQCPKELLAISGCK**RDDSSFP**AFKGN**TP**SNAK**PS**G**GEKS**AAAA**QPKP**STKA**ATEPIATK**PATVK
PAPVKPTKVVNKPKTASKVGG**TKTR**GKCPAT**KPTKPAAPQKS**AVAIYHQCGGSKSAYPDGSLSCASGS
KCVKMNDYYSQCVPN

Abb. A.6: Proteinsequenz (355 Aminosäuren) der Cel45. Die grau hinterlegten Bereiche sind das Signalpeptid (Aminosäuren 1-17), die katalytische Domäne (Aminosäuren 21-220) und das CBM (Aminosäuren 318-353). Das 97 Aminosäuren lange Linkerpeptid ist hervorgehoben, die Prolin- (P), Serin- (S) und Threoninreste (T) sind unterstrichen.

Tab. A.3: Zugangnummern der Proteine aus *F. graminearum* PH-1 in der Datenbank des Whitehead Institutes.

Protein	Zugangsnummer	Protein	Zugangsnummer
Cel5A	FG03795.1	Gluc1C	FG01685.1
Cel5B	FG01621.1	Gluc3A	FG06605.1
Cel5C	FG03918.1	Gluc3B	FG04913.1
Cel5D	Abb. A.7	Gluc3C	FG03858.1
Cel6	FG03628.1	Gluc3D	FG00088.1
Cel7A	FG00571.1	Gluc3E	FG00166.1
Cel7B	FG08253.1	Gluc3F	FG00767.1
Cel12A	FG11037.1	Gluc3G	FG02632.1
Cel12B	FG05851.1	Gluc3H	FG03139.1
Cel45	FG02658.1	Gluc3I	FG03387.1
Cel61A	FG07912.1	Gluc3J	FG03410.1
Cel61B	FG06110.1	Gluc3K	FG03570.1
Cel61C	FG02202.1	Gluc3L	FG03607.1
Cel61D	FG04681.1	Gluc3M	FG04711.1
Cel61E	FG03695.1	Gluc3N	FG04953.1
Cel61F	FG06397.1	Gluc3O	FG08609.1
Cel61G	FG03632.1	Gluc3P	FG09159.1
Cel61H	FG03968.1	Gluc3Q	FG10615.1
Cel61I	FG11488.1	Gluc3R	FG11181.1
Cel61J	Abb. A.8	CRE	FG09715.1
Cel61K	FG06208.1	ACEI	Abb. A.10
Cel61L	FG04773.1	XlnR	Abb. A.9
Cel61M	FG08011.1	HAP2	FG00352.1
Cel74	FG11208.1	HAP3	FG07087.1
Gluc1A	FG07351.1	HAP5	FG02608.1
Gluc1B	FG07274.1		

MSSGILKTDNERIVDANGDAVLLRGTA LGGWMLMENFMNGFPGREHQIRAALLKVLGQEKHDFFFDKF
 LEYFFTDKDAEFLASLKFNCLRLCLNYRHFEDDMNPVVIKEEGFKHVDRVINLCAKYGIYTIIDLHAL
 PGGQNQDWHSDNPTGYAAFWDHKHFQDRAINLWEHIARRYKGNPWVAGYNPMNEPADSEWTRLLAFYD
 RIVPAIRNIDPDHVLFLLEGNTFSMDFTGFDKVWENSVYAIHDYCGFGFPNRIGRFQGTQEYESYIRRM
 YDRKVEFMKKHNSSLTGLGEFGPIYERKEYNPDWEVQNEERYNMLDRQMAIYTSESIAWSIWSYKDVN
 VMGMTYVSPDSPWLKLLGPMIKKKRDLAVDSWAYDDAHLQDGLFGPLHKWFEDNVPAYSKKYPWQWR
 MHMHVFRGIRGITLAEYMIPEWADYFKDKTFEELDELAASWKYENCIQRGRLEILELYAPMKADDER
 LEGKVI ESEQNSGDGAI SKEQSVSGVGI FELSP EEKAKAELKKQQQQQP I PVAA

Abb. A.7: Proteinsequenz (531 Aminosäuren) der Cel5D aus *F. graminearum* PH-1

MHISLSLLCTAALAAAHGYVETATIGGQTYQFYNPYQDPYMNPLPKRISRAIPGNPVEDVTSIDMQC
NGYTAGGIKGSQPAALHAEAAAAGSTVNLKWLWLPDHSVGPVLTVMARCPDSGCDAWMPGTEKVWFKIQ
EAGRDGTSNNWASVCILPREPTLIPWLTCRDRSPLS

Abb. A.8: Proteinsequenz (172 Aminosäuren) der Cel61J aus *F. graminearum* PH-1.

ATGTTGTCCAATCCACTTCAACGTTTCTCTCCCTACCAGAACGCCGCTCATCCAACATCTCACCTGA
TGGAAACGTCCAGCAAGGCACAATGCAGAACGGCGGCCTGGACTCGCTCCAGAACCATCAGTATCCGA
TTCAACCACTCTCACAAAGCTGTGCCCTTTCAAACGGCCACTTTGAGAGGGCTGCCGCTCAAGTAAAG
AATCGACAACACCTTATGGAGTTCACCCACGCAGCTTCAGGACACTTCAGGGCCATTAGGAGACGAAT
CAGTCGAGACCTGCGATCAGTGTAACCAGTTACGAACAAAATGTGATGGCCAGCACCCCTGCGCGCACT
GTATTGGTAGGTTTTGATGTCAAGACGTCAATGTCTCTGTTCTGACTTGTGTAGAATTCGGCCTGGGG
TGCGAGTACATTCGCGAAAGGAAAAAGAGAGGAAAGGCGTACCGGAAAGAACTAGCCCAACAGGCTGC
GGCTCAGGCTGCGGCAGGTGGCACAGGCCAGAACATGGACGATTCTCTATCAGAGAACGGCCAGACTA
GCAGCAAAGGCCTCGAATCTTCGAATATGGGACTAGAGCAACAATCGAATGAACGACATCCGAGTACG
AGCAGCAAATCGAGTCGAGATCCAGGCGACGATGTGATGCGACATAACCAAGGCCCTCGAGGGTCTCGA
TCATCTTGGCAACATAAGCGAACAACCCCATCTTGGCCGGTCTTCTTGGATGGCGAACACATGGAAA
ACAACGGAGGTCTCGATCTGAACGGCTTCAATAGTATGCCGCATGCGTACGACTCGCAGGGCTTGGAT
GGTCTGTCTTGAACGGTCAATCATAACGCTCCCAACGGGCGAGGTAAACATGCCTGGCTACGCCGAATT
CCCATATACGATGCAGGCTCAAAGTCCGCCCAACTTCAACAACAACCTCTGCTTCCGTATGGGAAACA
GCCCCTAGGATACGCTATGGGCAAGGGAACATCTCTGGGTGGGGCATCTCCATGACTTCACCACCA
GGCCAATATCAAACACAGGCCCTCCCCCAACTTCAACAACCTCGAAACTGCGATATCCCGTCTTGA
GCCCATAATCCCATACCTCAACAACATAATTCTATCCCTCTAGCTTGGCGACTTGGTCGATCTCTACT
TTGCGTCTTCTCCTCGGCGCAAATGCACCCAATGTCAACCTATGTCTTGGGCTTTGTCTTCGAAAA
CGATACTTCTCGACCAGACAAGGCCAAGACCATGCCAACAGCCCTCTTGGCAAGCATGCTGTGGGT
TGCTGCACAGACAAGCGACGCCCTTCTCGCCAGTACACCTTCAGCGGTGCCAAGACGTGCCAAA
AGCTATTGGAGTCAAGTCTACCTCCTACGACCTCTCATCCACAGCCCCAAGTGTAGTCGCCCAAGC
CCTGTTGCTGATGTTGCTCTTGGCGGTCTCGGTGCGCCGGAAGCTCGACGATGTGATTACATACATT
CAGGAGTGGCGAATCGGGCCCTTTCGGTGCAGCCGGAAGCTCGACGATGTGATTACATACATT
TGGCGTTGTTGTTTTCTGCTAGCGAATAACAAGGGAGCGAGTATGCGGTGGTGGACTGCTGCTTGGGGT
CTTGCTCGTGTAGCTGAAGCTGGGCCGCGAGCTTCTCTTGGACCTTCAACCCGCGGCCAAGAGGCCAT
GGACACTGACGGTACTGAGGATGCTGAAGGCGGCATCAGTGGTAACGGATAT-**Sequenzlücke**-
GGAGGAGCGTGAGGAGCGACGCCGATATGGTGGCTTCTATATATTTGTCGACAGGCATCTGGCGCTCT
GCTACAATCGCCCCCTATTCTCTTACATCGAATGTCAAGGCTGTTACAGCCATGGATGATGCG
TATTGGCAGAGCGGCGAGTTTTCTCAACAACCTCAAACCTCAACCACGGATCCCAATCTTCTAGGAACAAG
TCCAGAGGGGTACAGGACTGATCACCCGATCCCATGGTCCCAGTACGAGTGTGCTGGCCATAGTA
TTTTCGGCTATTTCTGCTCTGATGACCATCTTGGGCGAGATCGTCGACTTGCATCACGCAAAGAAC
CATCCTCGCTTCGGTACTTCGTTCCGGCAAAGTCATGAGTGAATGCTCAGACCGCCGAGATTACTCG
ACATCTTGAGATATACGAGCAGAGTCTGCAATCTTTCGAGCGCAAGAATTTGCCCTCGACAAGTTGAGG
ATAGAGCCGACGTTGCAAATGAGGGTAACGGAGTTCTGAGACCAACACACCATCAGTCCACTCTGTG
CATAACGAATTCATCAAACCGACTTACAGAGAGCAATATTCAGACTCGCATTTGTTATTGCTTATGGAAC
CCATGTGATGCACGTGCTGCATATCCTCTCTTGGCAAGTGGGATCCTATTAACCTGTTGGATGATG
AAGACTTGTGGATTTCTTCGCAAGGGTTCATCACATCAACGAGCCATGCTGTTGCGGCAGCCGAGGCC
ATCAACCTGATACTTGAATTCGATCCTGGTCTGGAATTCATGCCGTTCTTCTTCGGTATCTATCTGCT
CCAGGGCTCGTTCTTACTGCTGCTTATCGCGGATAAGCTCCAGTCCGAGGCGTCCGCCAGCGTGGCAA
AGCATGCGAGACAATCGTGCAGGCTCACGAAGCATGCGTAGTAACCTAAGTACAGAAATACAGGTT
AGTTCTTTGAACGTTCAAGCTTTCTTGCAGTAACACTAACAGGTTTCATAGCGAAAATTCAGCAAGGTCAT
GCGCAGTGTCTTGGCCAAAGTTCGAGGTCGTGTACCCGAAGATCTTGGCGAGCAAACAGCAAAGGCCAA
GAGAACTTCTGGCGGTGTATCGGTGGACAAAGGACGGGACTGGTTTGGCACT**TGA**

Abb. A.9: Nukleotidsequenz (2896 bp, unvollständig) des *xlnr*-Gens aus *F. graminearum* PH-1. Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Die Sequenzlücke ist eingetragen und schwarz hervorgehoben.

ATGTCCTTCTCCCACCTCGTCGAAGGACTCCGGTGACTCGTCCGGACTGCGACACCGAGAATGCCTT
GTCTTTTAAGAACAGCTCTACCTCCGTAAGGGTGCGACCTTCCACTCTCCTACATCACCATCTTTGA
CTTCGGACATTGCCTTTGTCCCTCTACTTTGCCTCGAGCCAGTCCCATCTGGATGATGTCTCGAT
GCCAACCGTCGACGTGTGGCCTTGACTCTCAACGACATCGACGAGGCTCTTGCCAAGACCCAAGAGCT
CTCTCTGTCAATCCATGTCAAAGCCCATGACTCTTCGCGACACCGGTCTTCCATCCCTCGCGGCTTCC
TCGAGGGACCTATCGTCGATCCCAAGATGACAAAAAAGAGAGAGGGCGCACCTTGCGCCCCAGAGGC
CGCACTTCGCGGGCTCTTGAGGACCATTCCGATAGCGGTTTGGGTACATCAGTAGCTTCCACAAAACGA
GAAGCGGGGCGCGGTCACTGCATCAAAGGAGGCAAAGGTGCAAAACACGATGCCCTCACAAGATCCGCCG
CCGCCGCCGAGCAACGGGGAAGCTCCCTTCACTGGGATCAAAAAGCTTTTCAGCCGTATTCACGAGCAC
ACTTTACGCCCTTTGTTGGCCAAGCCGACCCTAAAAGAGTTCAAGCCTATTGTGCTTGACATTCCTAG
GAGAATTCAATCAAAGGAAATTAATTTGCTTGCGAGATCTTGAGAAAACCTGATCTTTATGGCACCGG
TAAGTCAGCTTCTGACTAATAATGGCGTTTGGGAAAAATACTTATCGGACTTTGTCTTTAAAGGAGAAG
GCTAAATCAGCAACCTTGTACCTGGATTTCTGCCTTACATCCGTCCGATGCATTCAGGCGACAGTCA
ATATCTTAGCGACCGCAACAAATTCGACCCGACAGCCGGCTTACACTAACGGATACTTCCCTCGACC
TTAAGGATCAGATTTTGAATAACGGAAAACAACTTGCCGCCAAGAACAGCGGCGACGAAATGGATATC
GACGCGTATGTACCCAGCTTCGTTCCCTTGAACCAACCACTAACTTGCCACAAAAGATCTGATGAGAT
CAAGCTCGTCGGTGGCCTTTCTGTGAACGGTCGTCTGCTGAGCTCGTTTCGTGTTTCGCAAGGACGGCA
CTTACATTTCCCTGGACACTGGCAAGCCTGTTCGAGACAGACGACGACGCGCAATGAAAATGAAGCGC
TCCCTTAGTCAACAGCTGGAGGATGAGGAGGAGATCCAGCGATCTATGGCTCGTCGCAAGAAGAACGC
TTCTCCCAGGAACTGGCCCCAAGAAATGCCGTGAGCCTGGCTGCAACAAAGAGTTCAAGAGGCCAT
GCGATTTAACAAGCACGAAAAGACCCACTCTCGCCCTTGGAAAGTGCCTGTCTCGACTTGCAAGTAC
CACACCTATGGCTGGCCCACTGAGAAGGAGATGGATCGTACCACAACGACAAGCACTCTGCTGCCCC
CGCCATGTATGAGTGCTCGTTTAAACCGTGCCCTACAAGTCAAAGCGTGAATCGAACTGCAAACAGC
ACATGGAGAAAGCTCACGGCTGGACCTACGTCCGAACCAAGACTAACGGCAAGAAGTTGCCGTCCATT
GCTGGTAGCGTTTACGAGCAGACCCCCCTCTGGGCAACATGTTCGACACCATCTTCGATCGAATATAA
CAGTGTCCCCACGCCTCCTCAAAACGAC-**Sequenzlücke**-
TTTTATCCAGCAACCTAAGGTGATGCAACAGCTGCCGCCATGTACCAGCAGGTTCCCTCAACAAATT
CCTCAGCCGATCCCTGTCCAACTGCTACATCTCAATTCTCGCAACCGGTGAGGAGACTGCCATGCT
CTTCAACCCTAACTCACTGAGAGATGTGATGAGGGGTTTCGATGACTCTTTTGGCGCAGACGGAATGG
ATTTTCCACTCTTCCCCGGCGGTAATGGTATGGCCAAGACCAACAATTATCAGCCGCTCTTTGGCGAG
ATTCCCAGTGCAAACGTGGGTTTCTCTCAAACTCCAGGACCCTTCCAAATGATGGACTGGTCCAG
TGTGGATTTCTCGAAACCTT**TGA**

Abb. A.10: Nukleotidsequenz (2092 bp, unvollständig) des *ace1*-Gens aus *F. graminearum* PH-1. Start- und Stopcodon sind schwarz hervorgehoben. Die Sequenzlücke ist eingetragen und schwarz hervorgehoben.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Moerschbacher danke ich für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, für die gute Betreuung bei der Durchführung der Arbeiten, für viele anregende Diskussionen und für motivierende Worte zur richtigen Zeit.

Herrn Dr. Prüfer danke ich für die Möglichkeit, die praktischen Arbeiten in den Laboren des Fraunhofer IME durchführen zu können. Ebenso danken möchte ich ihm für die Korrektur dieser Arbeit und für die gute Betreuung während meiner drei Jahre in Schmallenberg.

Herrn Prof. Dr. Stöcker danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an Steffi, die vor allem in praktischen Fragen eine unschätzbare Hilfe war und die durch ihren unermüdlichen Einsatz viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Beata, Kerstin und Thorsten, die nicht nur aufgrund ihrer fachlichen Qualifikationen unersetzlich waren, sondern die in diesen drei Jahren wesentlich mehr geworden sind als Arbeitskollegen.

Den Mitarbeitern am Fraunhofer IME in Schmallenberg möchte ich für ein angenehmes Arbeitsklima und drei interessante und lustige Jahre danken.

Meiner Freundin Maike möchte ich für ihre Hilfe und ihre Geduld während der gesamten Zeit danken.

Der letzte Dank gilt meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank!!

