

**Untersuchungen zur Regulation und Bedeutung
der Chitin-Synthese beim Maispathogen
Colletotrichum graminicola (CES.) WILS.
(Teleomorph: *Glomerella graminicola* POLITIS)**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Herrn Stefan Werner

geb. am 24. Oktober 1971
in Pforzheim

Gutachter:

1. Prof. Dr. Holger B. Deising
2. Prof. Dr. Dierk Scheel
3. Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Halle (Saale), den 6. Juni 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003520

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003520>]

für Annika und Henrike

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.B. Deising danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine zahlreichen Anregungen und für die Freiheiten, die er mir bei der Durchführung des Projekts eingeräumt hat.

Frau D. Jany danke ich für die technische Unterstützung, besonders für die DNA-/RNA-Extraktionen, die sie immer geduldig und zuverlässig durchgeführt hat.

Danken möchte ich allen, die trotz der manchmal unbefriedigenden räumlichen Situation zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben, besonders Sven, Una, Marcus und Janyce. Haltet die Ohren steif!

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, besonders meiner Frau Ingrid danken, die mich immer nach Kräften unterstützt hat und auf manches verzichten musste.

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
I.1 Biologie von <i>Colletotrichum graminicola</i>	1
I.2 Aufbau der pilzlichen Zellwand	4
I.2.1 Struktur der Zellwand	4
I.2.2 Apikales Spitzenwachstum und Biogenese der Zellwand	5
I.3 Genetik der Chitin Synthese	6
I.3.1 Chitin Synthese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
I.3.2 Chitin Synthese in filamentösen Pilzen - Modellorganismen	10
I.3.2.1 <i>Neurospora crassa</i>	10
I.3.2.2 <i>Aspergillus spec.</i>	10
I.3.3 Chitin Synthese in pflanzenpathogenen Pilzen	12
I.3.3.1 <i>Magnaporthe grisea</i>	12
I.3.3.2 <i>Blumeria graminis</i>	13
I.3.3.3 <i>Ustilago maydis</i>	13
I.4 Chitin Synthese als Angriffspunkt fungizider Wirkstoffe	14
I.5 Ziel der Arbeit	16
II Material und Methoden	18
II.1 Biologisches Material	18
II.1.1 Pilzmaterial und <i>in vitro</i> Infektionsstrukturen	18
II.1.1.1 Isolate und Kulturbedingungen	18
II.1.1.2 Differenzierung von <i>in vitro</i> Infektionsstrukturen	18
II.1.2 Pflanzenmaterial und Infektionsversuche	18
II.1.3 Anzucht und Kultur von Bakterien	19
II.2 Chemikalien	19
II.3 Molekularbiologie	20
II.3.1 Präparation von Nukleinsäuren	20
II.3.1.1 Präparation genomischer DNA	20
II.3.1.2 Schnelle Präparation genomischer DNA zum Einsatz in der PCR	20
II.3.1.3 Präparation von Plasmid- und Cosmid-DNA	21
II.3.1.4 Präparation von Gesamt-RNA	21
II.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	22

II.3.2.1 DNA-Agarose Gele	22
II.3.2.2 Denaturierende RNA-Agarose Gele	22
II.3.3 Hybridisierungen	22
II.3.3.1 Herstellung von Hybridisierungs-Sonden	22
II.3.3.2 Southern Blots	23
II.3.3.3 Kolonie-Hybridisierung	24
II.3.4 PCR-Anwendungen	25
II.3.4.1 Standard-PCR	25
II.3.4.2 Expand-PCR	26
II.3.4.3 Touchdown-PCR	26
II.3.4.4 Inverse PCR	27
II.3.4.5 RT-PCR	27
II.3.5 Klonierungstechniken	29
II.3.5.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
II.3.5.2 Modifikation der Enden verdauter DNA	29
II.3.5.3 Dephosphorylierung	29
II.3.5.4 Ligationen	30
II.3.5.5 Klonierung von PCR-Produkten	30
II.3.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse	30
II.3.7 Transformationstechniken	32
II.3.7.1 Transformation von <i>C. graminicola</i>	32
II.3.7.2 Transformation von <i>E. coli</i>	33
II.4 Chitin Synthase Gene von <i>C. graminicola</i>	34
II.4.1 Isolierung von Chitin Synthase-Genen	34
II.4.1.1 <i>ChsA</i> und <i>ChsB</i>	34
II.4.1.2 <i>ChsC</i> und <i>ChsD</i>	34
II.4.2 Inaktivierung von Chitin Synthase-Genen	35
II.4.2.1 <i>ChsA</i>	36
II.4.2.2 <i>ChsB</i>	36
II.4.2.3 <i>ChsC</i>	37
II.4.3 Expression des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) unter der Kontrolle von <i>Chs</i> -Promotoren	38
II.4.3.1 <i>ChsA</i>	38
II.4.3.2 <i>ChsB</i>	39
II.4.3.3 <i>ChsC</i>	39
II.5 weitere Methoden	39
II.5.1 Versuche mit dem Chitin Synthase Inhibitor Nikkomycin Z	39
II.5.2 Bestimmung des Chitin-Gehalts	40
II.5.2.1 Chemische Bestimmung	40
II.5.2.2 Calcofluor-Färbung	40

II.5.3 Mikroskopie	40
II.5.3.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	40
III Ergebnisse	42
III.1 Ergebnisse der Inhibitionsversuche	42
III.1.1 <i>in vitro</i> Tests	42
III.1.2 Infektionstest	44
III.2 Chitin Synthesen aus <i>C. graminicola</i>	45
III.2.1 Auswertung der Sequenzen	46
III.2.1.1 <i>ChsA</i>	46
III.2.1.2 <i>ChsB</i>	49
III.2.1.3 <i>ChsC</i>	49
III.2.1.4 <i>ChsD</i>	50
III.2.2 Untersuchungen zur Expression	50
III.2.2.1 RT-PCR	50
III.2.2.2 Promotor-GFP-Fusionen	51
III.3 Ergebnisse der Geninaktivierungen	53
III.3.1 Einführung	53
III.3.2 <i>ChsA</i>	54
III.3.2.1 Nachweis der Inaktivierung	54
III.3.2.2 Phänotyp der Mutanten	56
III.3.3 <i>ChsB</i>	59
III.3.3.1 Nachweis der Inaktivierung	59
III.3.3.2 Phänotyp der Mutanten	60
III.3.4 <i>ChsC</i>	61
III.3.4.1 Nachweis der Inaktivierung	61
III.3.4.2 Phänotyp der Mutanten	63
III.3.4.3 Infektionsversuche	67
IV Diskussion	68
IV.1 <i>C. graminicola</i> als Modellorganismus für pflanzenpathogene Pilze	68
IV.2 Versuche mit CHS-Inhibitoren bei pflanzenpathogenen Pilzen	68
IV.3 Chitin Synthesen: eine Multi-Gen-Familie	70
IV.3.1 Funktion einzelner Gene	70
IV.3.1.1 Übersicht	70
IV.3.1.2 <i>Chs</i> -Gene von <i>C. graminicola</i>	72
IV.3.2 Struktur der Chs-Proteine	74

IV.3.2.1 Beziehung zum Cytoskelett	75
IV.3.3 Regulation der CHS-Aktivität	77
IV.3.3.1 regulatorische Promotorelemente	77
IV.3.3.2 Regulation auf Transkript- und Proteinebene	78
IV.3.3.3 Signalwege bei der Regulation	81
IV.3.3.4 Reaktion der Chitin Synthese auf Stress	83
IV.3.4 Chitin Synthese und Pathogenität	84
V Zusammenfassung - Summary	86
V.1 Zusammenfassung	86
V.2 Summary	87
VI Literatur	89
VII Anhang	103
VII.1 Zusammensetzung von <i>Colletotrichum</i> Nährmedien	103
VII.1.1 Haferflockenagar	103
VII.1.2 Kompletmedium (CM)	103
VII.1.3 Regenerations- und Selektionsmedium für Transformation	103
VII.2 <i>C. graminicola</i> Isolate	104
VII.3 Primer	104
VII.4 Sequenz der <i>Chs</i> -Gene	107
VII.4.1 <i>ChsA</i>	107
VII.4.2 <i>ChsB</i>	108
VII.4.3 <i>ChsC</i>	110
VII.4.4 <i>ChsD</i>	113
VII.5 Abkürzungsverzeichnis	114
VII.6 Anmerkungen zur Schreibweise	115

I Einleitung

I.1 Biologie von *Colletotrichum graminicola*

Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson (Teleomorph: *Glomerella graminicola* Politis) gehört zur Gruppe der Ascomyceten (Pyrenomycetes, Phyllachorales) und ist der Erreger von Anthraknose-Blattflecken und Stängelfäule an verschiedenen Gräsern, u.a. an Mais (Wilson, 1914). Eine gute Zusammenfassung über Biologie, Entwicklungszyklus und Bekämpfungsstrategien für dieses Pathogen erschien vor zwei Jahren (Bergstrom & Nicholson, 1999). Die wichtigsten Punkte sollen aber im Folgenden nochmals näher erläutert werden.

Bei *C. graminicola* handelt es sich um ein fakultatives Pathogen, d.h. der Pilz ist auch in der Lage, saprophytisch auf abgestorbenem Pflanzenmaterial zu wachsen, was für die Überwinterung und die Bildung des primären Inokulums im Frühjahr von entscheidender Bedeutung ist. Die Vermehrung in der Natur erfolgt asexuell über die Bildung sichelförmiger Konidien in speziellen Sporenlagern, den Acervuli. Die Konidien sind in den Acervuli in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, die verschiedene wichtige Komponenten enthält. Den Hauptanteil der Matrix macht eine Mischung hochmolekularer Glykoproteine aus, welche das Überleben der Sporen unter trockenen Bedingungen für mehrere Wochen garantieren (Nicholson & Moraes, 1980). Die Sporen können sogar in getrockneter Form vom Wind verbreitet werden. Da diese Proteine einen hohen Prolin-Anteil besitzen, sind sie außerdem in der Lage, von der Pflanze produzierte toxische Polyphenole zu binden und dadurch zu entgiften (Nicholson *et al.*, 1986). Eine weitere Komponente ist ein Keiminhibitor, Mycosporin-Alanin, der verhindert, dass die Sporen bereits im Acervulus auskeimen (Leite & Nicholson, 1992). Die Wirkung dieses Inhibitors wird schon durch eine zehnfache Verdünnung aufgehoben, z.B. bei der Ausbreitung der Sporen durch Regen und Spritzwasser. Als weitere wichtige Bestandteile der Matrix sind verschiedene Enzyme zu nennen, welche die Etablierung der Sporen auf dem Blatt und die Penetration bewirken bzw. erleichtern. Dazu gehören u.a. Laccasen, unspezifische Esterasen und Cutinasen (Anderson & Nicholson, 1996; Pascholati *et al.*, 1993). Vor allem letztere scheinen für eine erfolgreiche Etablierung auf der Pflanze wichtig zu sein, wie Inhibitionsversuche mit dem Serin-Esterase Inhibitor Diisopropylfluorophosphat (DIPF) zeigen konnten (Pascholati *et al.*, 1993).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Ausbreitung der Konidien ist deren Fähigkeit, an die Blattoberfläche zu adherieren. Die Adhäsion ungekeimter Konidien geschieht innerhalb von

30 min, also lange vor der Keimung (nach ca. 5-6 h). Die Adhäsion ist nur auf hydrophoben Oberflächen effektiv und hängt von der aktiven Sekretion von Glykoproteinen ab, allerdings nicht von der extrazellulären Matrix, in welche die Konidien im Acervulus eingebettet sind (Mercure *et al.*, 1994b). Auf Maisblättern konnte nach Entfernen der Konidien mit einem Mikromanipulator auch gezeigt werden, dass die Struktur der Blattoberfläche verändert ist und dass sich an den entfernten Konidien Reste eines adhäsiven Materials befinden (Mercure *et al.*, 1994a).

Vor der Keimung wird die Konidie von einem Septum quergeteilt und eine der beiden Hälften, selten auch beide, keimen dann aus und bilden meist unmittelbar an der Spore anliegend, manchmal aber auch mit einem kurzen Keimschlauch, ein Appressorium. Von diesem ausgehend wird die Epidermis des Wirts direkt penetriert. Zu diesem Zweck kommt es im Appressorium zum Aufbau eines hohen Turgordrucks, welcher gezielt auf die Penetrationspore an der Basis des Appressoriums gerichtet wird, so dass dort hohe Kräfte auf die darunterliegende Blattepidermis wirken (ausführlicher Überblick in Deising *et al.*, 2000). Mit Hilfe optischer Wellenleiter ist es gelungen, die Kräfte einzelner Appressorien zu messen, welche im Durchschnitt ca. 17 μN betragen (Bechinger *et al.*, 1999). Daraus lässt sich ein ungefährender Druck im Appressorium von 5,35 MPa berechnen. Beide Werte liegen in derselben Größenordnung wie sie für ein anderes Getreidepathogen, *Magnaporthe grisea*, über indirekte Turgormessungen ermittelt wurden (Howard *et al.*, 1991). Einen sehr anschaulichen Vergleich bringt Money, wenn er schreibt, dass mit derselben Kraft pro Fläche ein Mensch in der Lage wäre, mit einer Hand einen ausgewachsenen Killerwal hochzuheben (Money, 1999). Dieser Vergleich macht deutlich, dass der Stabilität der Appressorienzellwand eine besondere Bedeutung zukommt, weshalb auf deren Zusammensetzung und Genese im Folgenden (siehe Punkt I.2) noch genauer eingegangen wird.

Eine weitere notwendige Voraussetzung, um diesen hohen Turgordruck aufbauen zu können, ist die Melanisierung der Appressorien. Es ist schon lange bekannt, dass Melanindefiziente Mutanten von *Colletotrichum* spp. bzw. *M. grisea* und auch Wildtypisolate, die mit einem Melaninbiosynthese-Inhibitor behandelt wurden, nicht mehr in der Lage sind, Wirtsepidermiszellen zu penetrieren (Kubo *et al.*, 1982; Wolkow *et al.*, 1983; Rasmussen & Hanau, 1989; Kubo & Furusawa, 1991). In *M. grisea* konnte gezeigt werden, dass Melanin die Porendurchmesser der Appressorienwände auf unter 1 nm reduziert und somit nur noch Wasser, aber keine größeren gelösten Stoffe diese Schicht passieren können (Howard *et al.*, 1991). Da gleichzeitig im Appressorium Glycerolkonzentrationen von über 3 molar aufgebaut werden, führt dies zu dem oben beschriebenen enormen Anstieg im Turgordruck (de Jong *et*

al., 1997). Der grundsätzliche Mechanismus scheint in *C. graminicola* der gleiche zu sein, und auch hier scheint Glycerol der entscheidende Metabolit zu sein (Sugui, J. und Deising, H.B., persönliche Mitteilung). Inwiefern auch zellwandabbauende Enzyme für die Penetration eine Rolle spielen, ist für *C. graminicola* noch nicht endgültig geklärt, sie dürften aber eine unterstützende Funktion haben (Nicholson *et al.*, 1976). Zumindest bei *Colletotrichum* sp., die dikotyle Pflanzen befallen, scheinen diese eine wichtige Rolle zu spielen (Wattad *et al.*, 1995; Wijesundera *et al.*, 1989). Dumas und Mitarbeiter konnten beispielsweise die Expression einer endo-Polygalacturonase in Appressorien von *C. lindemuthianum* vor der Penetration nachweisen (Dumas *et al.*, 1999).

Nach der Penetration der Epidermiszelle bilden sich zunächst ein Infektionsvesikel und primäre Infektionshyphen. In dieser Phase der Besiedlung ernährt sich der Pilz biotroph, d.h. die Plasmamembran der Wirtszelle bleibt intakt (Bergstrom & Nicholson, 1999; Nicholson, 1992). Im weiteren Verlauf der Entwicklung bilden sich sekundäre, nekrotroph wachsende Infektionshyphen und nach wenigen Tagen neue Sporenlager.

Der Befall von Stängeln erfolgt grundsätzlich nach demselben Muster, der Befall des Stängelinneren, der dann zur Fäule führt, wird allerdings durch Verwundungen, z.B. von stängelbohrenden Insekten stark gefördert. Die Besiedlung von Xylemgefäßen führt anschließend zu einer systemischen Ausbreitung. Dabei werden ovale Konidien gebildet, deren Funktion aber noch nicht genau geklärt ist (Bergstrom & Nicholson, 1999; Panaccione *et al.*, 1989).

Die Reaktion der Pflanze besteht zunächst hauptsächlich in der Aktivierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels. Es kommt zur Ausbildung von Papillen unterhalb der Penetrationsstelle (Politis & Wheeler, 1973) und zur chemischen und physikalischen Verstärkung der Zellwände um die Infektionsstelle herum (Esterifizierung, Lignifizierung). Die Bildung einer Anthocyan-Komponente dient wahrscheinlich zur Entgiftung toxischer Substanzen des Pilzes (Bergstrom & Nicholson, 1999 und darin enthaltene Zitate). Eine weitere Abwehrreaktion ist die Synthese von PR-Proteinen (*pathogenesis related*), darunter einige Chitinasen und 1,3- β -Glucanasen, die vermutlich antifungale Wirkung haben (Nasser *et al.*, 1988; Nasser *et al.*, 1990). Der Zusammenhang zwischen PR-Proteinsynthese und Resistenz gegenüber *C. graminicola* ist allerdings noch nicht untersucht.

I.2 Aufbau der pilzlichen Zellwand

Die pilzliche Zellwand hat eine Reihe verschiedener Funktionen zu erfüllen. Sie schützt die Zelle vor chemischen und physikalischen Einwirkungen, sie bestimmt die Form der Zelle, reguliert zu einem gewissen Grad den Stoffaustausch mit der Umgebung und stellt den Kontakt zur Umwelt her. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Zellwand sehr komplex aufgebaut und ihre Biogenese stark kontrolliert ist. Einen guten Überblick dazu gibt Moore (1998; Kap. 2).

I.2.1 Struktur der Zellwand

Der prinzipielle biochemische Aufbau pilzlicher Zellwände ist schon seit längerer Zeit bekannt (Wessels & Sietsma, 1981). Da sich sowohl die Zellwände der einzelnen systematischen Pilzgruppen, als auch innerhalb einer Gruppe, ja sogar innerhalb derselben Art z.T. deutlich unterscheiden, soll im Folgenden nur auf allgemeine Charakteristika eingegangen werden. Sentandreu und Mitarbeiter geben einen Überblick über die verschiedenen Zellwandpolymere (Sentandreu *et al.*, 1994).

Zu den hauptsächlich strukturgebenden Polymeren zählen Chitin (das Homopolymer aus β -1,4-verknüpften N-Acetyl-Glucosamineinheiten; GlcNAc) sowie α - und β -Glucane. α -Glucane enthalten 1,3- und 1,4-Verknüpfungen, die β -Glucane 1,3- und 1,6-Verknüpfungen. Chitin liegt in Form von Mikrofibrillen in der Zellwand vor, die Glucane können sowohl linear, als auch verzweigt sein. In *Aspergillus nidulans* konnte gezeigt werden, dass Defekte in der Chitin- und β -Glucan-Synthese zur Lyse der Hyphen führen, beide also für die Stabilität der Zellwand entscheidend sind (Borgia & Dodge, 1992). Chitin und Glucane sind auch untereinander über Wasserstoffbrücken und kovalente Bindungen verknüpft (Sietsma & Wessels, 1979; Kollar *et al.*, 1995).

Eine weitere wichtige Komponente sind die Glykoproteine, hauptsächlich Mannoproteine. Glykoproteine können sowohl über Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker in der Plasmamembran verankert sein (Stratford, 1994), relativ locker mit der Zellwand assoziiert sein oder auch kovalent mit anderen Wandbestandteilen verknüpft sein und damit nicht unwesentlich zur deren Stabilität beitragen (Kollar *et al.*, 1997). Einige Wandproteine besitzen auch enzymatische Aktivität, z.B. α - und β -Glucosidasen oder Chitinasen, die die Wandeigenschaften modifizieren können.

Auf der Oberfläche von Hyphen, die auf hydrophoben Unterlagen oder als Luftmycel wachsen, findet sich eine Schicht aus stäbchenförmig angeordneten Proteinaggregaten,

bestehend aus Hydrophobinen (Wessels, 1994). Diese amphipathischen Proteine aggregieren von selbst auf der Hyphenoberfläche und vermitteln so den Kontakt von hydrophiler Zellwand zum hydrophoben Außenmedium.

I.2.2 Apikales Spitzenwachstum und Biogenese der Zellwand

Kennzeichnend für pilzliche Hyphen ist das apikale Spitzenwachstum, das bei anderen Organismen nur sehr selten auftritt (z.B. bei Pollenschläuchen und Wurzelhaaren). Zur Erklärung der Ereignisse am Apex wurden verschiedene Modelle entwickelt, die in jüngerer Zeit nun zu einem Gesamtmodell zusammengefasst wurden, was das Spitzenwachstum und die Biogenese der Zellwand wohl sehr treffend beschreibt (Bartnicki-Garcia, 1999; Moore, 1998; Wessels, 1993).

Das *steady state*-Modell (Sietsma & Wessels, 1994) beschreibt den Apex als eine Region mit plastischer Zellwand. Sekretorische Vesikel, die Zellwandbestandteile und synthetisierende und vernetzende Enzyme enthalten, fusionieren am Apex mit der Plasmamembran. Die dort neu gebildeten Wandpolymere sind zunächst noch nicht miteinander verknüpft. Während ständig weitere Vesikel fusionieren und neue Zellwand synthetisiert wird, erfolgt die Quervernetzung der zuvor gebildeten Polymere, die sich nun im subapikalen Bereich befinden. Mit zunehmender Entfernung vom Apex wird die Zellwand also immer stabiler und unelastischer, während der Apex durch die ständige Sekretion plastisch bleibt.

Der Bedarf an Vesikeln ist dabei ganz enorm: Bei einem gut untersuchten Isolat des Modellorganismus *Neurospora crassa* ist die Fusion von ca. 40.000 Vesikeln pro Minute mit der Plasmamembran erforderlich, um eine Wachstumsgeschwindigkeit der Hyphe von 18,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ zu erreichen (Collinge & Trinci, 1974). Es ist daher nicht erstaunlich, dass das Zellvolumen innerhalb 1 μm Abstand vom Apex zu 80 % aus Vesikeln besteht (Carlile & Watkinson, 1995).

Die bevorzugte Fusion von Vesikeln am Apex wird durch das Modell des *vesicle supply centers* (VSC) beschrieben (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). Das VSC, in höheren Pilzen repräsentiert durch den Spitzenkörper, stellt eine Ansammlung von Vesikeln im Apex dar. Von dort aus werden Vesikel in alle Richtungen sekretiert, die höchste Dichte natürlich am Apex, in der unmittelbaren Nähe des VSC. Die Form der Hyphe wird dabei maßgeblich von den beiden Parametern N = Zahl der freigesetzten Vesikel pro Zeiteinheit und V = Vorschubgeschwindigkeit des VSC bestimmt (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989). Der Durchmesser der Hyphe ist dabei proportional zum Verhältnis N/V , d.h. je größer die Zahl der

Vesikel und je geringer die Vorschubgeschwindigkeit, desto größer wird der Durchmesser der Hyphe. Gleichzeitig bestimmt das Verhältnis N/V auch den Abstand des VSC vom Apex, was wiederum bedeutet, dass dieser Abstand proportional zum Hyphendurchmesser ist. Durch Veränderung dieser Parameter lassen sich im Computer verschiedene Formen des Hyphenwachstums simulieren, angefangen vom ellipsoiden Hefewachstum bis hin zu komplexen Mustern wie keimende Sporen oder die Entwicklung von Konidiophoren (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989).

Durch Manipulation des VSC konnten Richtungsänderungen im Wachstum und sogar die Initiation von Verzweigungen induziert werden (Bartnicki-Garcia, 1999). Letzteres lässt auch vermuten, dass die Vesikel neben Enzymen der Zellwandsynthese auch hydrolytische Enzyme (Chitinasen, Glucanasen) enthalten, die festvernetzte Wände in plastische umwandeln können.

Eine weitere wichtige Komponente für das apikale Wachstum scheint das Cytoskelett, insbesondere die Aktinfilamente zu sein (Heath, 1994; Heath, 1995). Diese könnten verschiedenen Funktionen ausüben: Zum einen können Vesikel entlang der Filamente transportiert werden, zweitens kann über assoziierte Proteine eine Verbindung zur Plasmamembran und zur Zellwand hergestellt und dadurch eine zusätzliche mechanische Stabilität erreicht werden, um die plastische Wand am Apex gegen den Turgordruck zu schützen. Des Weiteren kann ebenfalls über assoziierte Proteine eine Signalperzeption erfolgen, z.B. über die mechanische Spannung der Membran bedingt durch die Topografie der Unterlage, die dann wieder unmittelbaren Einfluß auf Zusammensetzung, Transportrate und Lokalisierung der Vesikel hat.

Die Membranspannung scheint darüber hinaus auch einen direkten Einfluss auf die Aktivität von Chitin-Synthasen zu haben, so dass eine Plastifizierung der Wand durch lytische Enzyme (wie sie z.B. bei Beginn von Verzweigungen auftritt), zu einer Neusynthese von Wandmaterial führt (Gooday & Schofield, 1995).

I.3 Genetik der Chitin Synthese

Chitin als einer der Hauptbestandteile der pilzlichen Zellwand hat schon lange das Interesse von Forschern hervorgerufen. Um so erstaunlicher ist es, dass das Enzym, welches die Synthese von Chitin katalysiert, biochemisch nur relativ schlecht charakterisiert ist. Dies kann mit Problemen bei der Isolierung und Solubilisierung dieser integralen Membranproteine begründet werden (genauere Ausführungen zur Biochemie z.B. bei Merz *et al.*, 1999). Chitin Synthasen (EC 2.4.1.16; UDP-N-Acetyl-D-Glucosamin : Chitin 4- β -N-

Acetylglucosaminyltransferase) katalysieren die Addition von GlcNAc-Einheiten an eine wachsende Kette von Chitin. Der Zucker wird dabei in der aktivierten Form von Uridindiphosphat- (UDP-) GlcNAc bereitgestellt, das Enzym benötigt für die Reaktion bivalente Kationen. Das primäre Produkt sind einzelne lange Chitin-Ketten, die sich erst später zu dickeren Fibrillen zusammenlagern. Für den zeitlichen Abstand zwischen Synthese und Aggregation der einzelnen Ketten gibt es mehrere experimentelle Hinweise. Inkubiert man z.B. Membranpräparationen von *Agaricus bisporus* nur für kurze Zeit (6 min) mit dem Substrat, bilden sich dünne, lange Fibrillen. Nach längeren Inkubationszeiten (25 min) finden sich dagegen dicke Fasern, bestehend aus mehreren umeinander gewundenen dünnen Fibrillen (Merz *et al.*, 1999). Neu gebildetes Chitin in Membranpräparationen von *Schizophyllum commune* ist im Gegensatz zu "älterem" Chitin hoch anfällig für den Verdau durch Chitinasen (Vermeulen & Wessels, 1986). Die Zugabe von Calcofluor White verhindert die Kristallisation und bewirkt eine lang dauernde Anfälligkeit gegenüber Chitinasen. Beides spricht stark für eine zeitliche Lücke zwischen Synthese des Chitins und Kristallisation zu Fibrillen.

Die meisten Daten zu Chitin Synthesen stammen aus genetischen Untersuchungen, was auch die hohe Anzahl an Einträgen in der Datenbank belegt (ca. 300 Treffer unter den Stichwörtern „chitin synthase“ und „fungi“). Aufgrund von Sequenzvergleichen werden die Chitin Synthase Gene der echten Pilze in fünf Klassen eingeteilt (Bowen *et al.*, 1992; Din *et al.*, 1996; Specht *et al.*, 1996). Klasse I-III Gene haben hohe Homologie zu den Hefegenen *Chs1* und *Chs2* (siehe I.3.1), wobei Klasse III Gene nur in filamentösen Pilzen vorkommen. Klasse IV weist Homologie zu *Chs3* aus *Saccharomyces cerevisiae* auf, Klasse V ist diesen ähnlich, kommt aber wie Klasse III nur in filamentösen Pilzen vor. Ein Organismus besitzt normalerweise Gene aus mehreren, manchmal aus allen Klassen (z.B. *Aspergillus fumigatus* und *Ustilago maydis*, siehe I.3.2 und I.3.3). Eine weitere Klasse wurde vor kurzem für Gene definiert, die ausschließlich in Oomyceten vorkommen und nur mäßige Homologie zu den anderen Klassen aufweisen (Werner *et al.*, 2002).

Allen Chitin Synthesen gemeinsam ist ein relativ schlecht konservierter, hydrophiler N-terminaler Bereich, ein neutraler mittlerer Bereich und ein stark konservierter C-terminaler Bereich mit mehreren membranspannenden Domänen. Auch das katalytische Zentrum befindet sich sehr wahrscheinlich in der C-terminalen Hälfte. Yamada-Okabe und Mitarbeiter konnten in zwei Arbeiten an *S. cerevisiae Chs2* mehrere konservierte Aminosäuren identifizieren, die für die Aktivität absolut entscheidend sind (Nagahashi *et al.*, 1995; Yabe *et al.*, 1998). Cos *et al.* (1998) führten ähnliche Untersuchungen an *Chs3* durch und konnten dort

auch die Bedeutung des C-Terminus für die Aktivität belegen. Ford und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der nicht-homologe N-Terminus von *Chs1* und *Chs2* weder für die Aktivität *in vitro* noch für die Funktion der beiden Enzyme *in vivo* nötig ist, dass aber weitere Verkürzungen in den homologen Bereich hinein bzw. schon geringfügige Verkürzungen des C-Terminus die Aktivität stark beeinträchtigen (Ford *et al.*, 1996). Da die *Chs*-Gene in filamentösen Pilzen den Genen der Bäckerhefe strukturell sehr ähnlich sind und auch die oben erwähnten Aminosäuren nahezu 100 %ig konserviert sind, lassen sich die Ergebnisse aus Hefe teilweise auch auf diese Gene übertragen. Eine Ausnahme davon stellen mit Sicherheit die Enzyme vom Csm-Typ (Csm = Chitin Synthase mit Myosin-artiger Domäne; Klasse V) dar, deren N-Terminus *in vivo* offensichtlich eine essentielle Funktion erfüllt (siehe I.3.2.2).

I.3.1 Chitin Synthese in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist der am besten untersuchte pilzliche Modellorganismus. Und obwohl Chitin dort nur ca. 1-3 % der Zellwand ausmacht, ist hier auch die Genetik der Chitin Synthese am besten bekannt. Aus der Fülle der Literatur sollen im Folgenden nur die wesentlichen Dinge kurz erläutert werden. Gute Übersichtsartikel sind z.B. die von Bulawa (1993), Cabib *et al.* (1996) und Valdivieso *et al.* (1999).

In *S. cerevisiae* gibt es drei Chitin Synthase Aktivitäten (CS I – III), die unterschiedliche Aufgaben während des Zellzyklus wahrnehmen und unterschiedlich reguliert sind. Für die Aktivität von CS I und CS II ist jeweils ein Strukturgen (*Chs1* bzw. *Chs2*) verantwortlich, wohingegen für die Aktivität von CS III *in vivo* mehrere Gene notwendig sind (*Chs3-7*).

Obwohl CS I über 90 % der *in vitro* messbaren Chitin Synthase Aktivität ausmacht, spielt sie *in vivo* nur eine unbedeutende Rolle. Chs1p, das entsprechende Genprodukt, wirkt als Reparaturenzym bei der Knospung, bei der Mutter- und Tochterzelle durch Chitinolyse voneinander getrennt werden. Ein übermäßiger Zellwandabbau wird dabei durch die Aktivität von Chs1p verhindert. Die Regulation der CS I Aktivität erfolgt hauptsächlich posttranslational (Choi *et al.*, 1994a), zum einen wahrscheinlich über eine gesteuerte Proteolyse, die zumindest *in vitro* zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivität führt, zum anderen existiert ein endosomaler Pool, die Chitosomen, von dem aus Chs1p bei Bedarf zur Plasmamembran transportiert wird (Ziman *et al.*, 1996).

Das für die CS II Aktivität verantwortliche Enzym Chs2p weist eine hohe Homologie zu Chs1p auf und besitzt ähnliche, aber nicht identische, biochemische Eigenschaften (Aktivierung durch Proteolyse und das Substrat GlcNAc, aber unterschiedliche Aktivierung durch bestimmte bivalente Kationen und unterschiedliche pH-Optima (Choi & Cabib, 1994)).

Trotzdem ist die Funktion und Regulation *in vivo* komplett verschieden. Chs2p ist für die Synthese des primären Septums zwischen Mutter- und Tochterzelle bei der Knospung zuständig. $\Delta chs2$ -Zellen weisen dicke amorphe Septen auf, die vollständige Ablösung der Tochterzellen ist häufig unterbunden, was zu Zellaggregaten führt, und die Zellen besitzen zum Teil mehrere Kerne.

Die Regulation der CS II Aktivität scheint fast ausschließlich transkriptionell zu erfolgen, obwohl, zumindest *in vitro*, auch Proteolyse eine Rolle spielt. Chs2p ist ein sehr instabiles Protein und wird schnell über Endocytose zur Vakuole transportiert, wo der Abbau stattfindet (Choi *et al.*, 1994a; Chuang & Schekman, 1996). Die Synthese von Chs2p erfolgt zellzyklusabhängig nur zu dem Zeitpunkt, an dem Bedarf besteht.

Einer exakten Regulation unterliegt auch die dritte Chitin Synthase Aktivität **CS III**, die für den größten Teil der Chitin Synthese *in vivo* zuständig ist, und für die mehrere Gene verantwortlich sind (Bulawa, 1992). Zu den Aufgaben von CS III gehört die Synthese eines Chitin-Rings an der Stelle einer beginnenden Knospung, die Bildung von Chitin während der sexuellen Vermehrung und der Ascosporenproduktion und nicht zuletzt die Synthese des in der Zellwand verteilten Chitins. Die CS III Aktivität ist – ähnlich wie CS I – hauptsächlich posttranslational reguliert (Choi *et al.*, 1994a). Das Protein Chs3p, das die katalytische Funktion besitzt, wird wie Chs1p über Endozytose in die Zelle aufgenommen, dort aber nicht abgebaut, sondern für eine spätere Verwendung in Chitosomen gelagert (Chuang & Schekman, 1996; Ziman *et al.*, 1996). Interessanterweise wird Chs3p im Gegensatz zu den beiden anderen Enzymen durch eine proteolytische Behandlung inaktiviert, wenn nicht das Substrat während der Behandlung vorhanden ist. In diesem Fall führt die Proteolyse zu einer ungefähr zehnfachen Erhöhung der Aktivität (Choi *et al.*, 1994b).

Für die CS III Aktivität *in vivo* sind noch die Produkte von mindestens 4 weiteren Genen notwendig (*Chs4-7*): Das Genprodukt von *Chs4* spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei der korrekten Lokalisierung von Chs3p an der Knospungsstelle, um dort den oben erwähnten Chitin-Ring zu bilden (DeMarini *et al.*, 1997). Chs4p interagiert dabei offensichtlich direkt mit Chs3p und scheint auch direkt dessen Aktivität zu modulieren (Ono *et al.*, 2000), eventuell indem es die Faltung von Chs3p beeinflusst (Trilla *et al.*, 1997). Chs5p ist ein Protein, das in trans-Golgi oder post-Golgi Vesikeln lokalisiert ist, von denen viele, aber nicht alle auch Chs3p enthalten (Santos & Snyder, 1997). Da in $\Delta chs5$ -Zellen Chs3p nicht mehr wie im Wildtyp an der Knospungsstelle und in den Verbindungen zwischen Mutter- und Tochterzelle zu finden ist, sondern nur noch in cytoplasmatischen Vesikeln, scheint es sich bei Chs5p um ein für den Transport von Chs3p zur Plasmamembran notwendiges Protein zu

handeln. Darüber hinaus scheint Chs5p auch weitere Funktionen bei der Zellfusion während des *matings* einzunehmen (Santos *et al.*, 1997). Chs6p ist ein Protein, das spezifisch für den Transport von Chs3p von den Chitosomen zur Plasmamembran notwendig ist (Ziman *et al.*, 1998). Interessanterweise ist der Transport von Chs1p in $\Delta chs6$ -Stämmen nicht beeinträchtigt. Außerdem muss auch ein Chs6p unabhängiger Transportweg vorhanden sein, der z. B. bei der erhöhten Chitin Synthese in Glucan Synthase (*fks1*) defizienten Mutanten beschränkt wird (Osmond *et al.*, 1999). Ebenfalls für den Transport von Chs3p notwendig ist das Produkt von *Chs7*. Dieses ist für den Export von Chs3p aus dem endoplasmatischen Reticulum verantwortlich, ohne dabei die Sekretion anderer Proteine wie Chs1p, Chs2p oder α -Faktor zu beeinflussen (Trilla *et al.*, 1999).

I.3.2 Chitin Synthese in filamentösen Pilzen - Modellorganismen

I.3.2.1 *Neurospora crassa*

N. crassa ist der erste filamentöse Pilz, aus dem ein Chitin Synthase Gen isoliert und mittels Mutagenese funktional charakterisiert wurde (Yarden & Yanofsky, 1991). *Chs1* gehört zur Klasse III der CHS-Gene, die in Hefe nicht vorkommt. In diesem Gen defiziente Mutanten weisen eine stark reduzierte Wachstumsrate und Sporulation auf. Die Hyphen zeigen blasige Ausstülpungen, die Septierung ist aber normal. Neben *Chs1* wurden noch 3 weitere Gene beschrieben (*Chs2-4*), die zu den Klassen II, I und IV zählen (Din *et al.*, 1996; Din & Yarden, 1994). Weder $\Delta chs2$ noch $\Delta chs4$ Mutanten weisen dabei - von einer Reduktion der CHS Aktivität bzw. des Chitin Gehalts abgesehen - einen besonders auffälligen Phänotyp auf. Über *Chs3* liegt noch keine Veröffentlichung vor.

Zwei weitere Studien beschäftigen sich indirekt mit Chitin Synthese in *N. crassa*. Eine Arbeit zeigt mit Hilfe heterologer Antikörper gegen Chs2p von *S. cerevisiae* eine Lokalisierung von Chitin Synthase in cytosolischen Vesikeln (Chitosomen), deren Dichte zum Hyphenapex hin zunimmt (Sietsma *et al.*, 1996). Eine weitere Arbeit zeigt die Aktivierung der Chitin Synthese durch Calmodulin, was einen Hinweis auf die *in vivo* Regulation des Enzyms /der Enzyme gibt (Suresh & Subramanyam, 1997).

I.3.2.2 *Aspergillus spec.*

In dieser Gattung fanden bislang hauptsächlich die beiden Arten *A. fumigatus* und *A. nidulans* Beachtung. *A. fumigatus* ist ein fakultatives Pathogen an Säugern, inklusive

Menschen, besonders an Patienten mit verringerter Immunantwort. Insgesamt sind aus diesem Organismus sieben Chitin Synthase Gene ganz oder teilweise isoliert und z.T. in Geninaktivierungsstudien auf ihre Funktion hin untersucht worden. In einer ersten Arbeit wurden sechs Fragmente (*ChsA-F*) aus allen fünf Klassen isoliert (Mellado *et al.*, 1995), ohne diese genauer zu charakterisieren. Dies geschah im Folgenden mit den Genen *ChsC* und dem neu hinzugekommenen *ChsG* (Mellado *et al.*, 1996a), sowie mit *ChsD* (Mellado *et al.*, 1996b) und *ChsE* (Aufauvre-Brown *et al.*, 1997). Am interessantesten dabei war, dass die Phänotypen der $\Delta chsC$ - und $\Delta chsG$ -Mutanten, obwohl beide zur Klasse III zählen, sehr unterschiedlich waren. Während die Inaktivierung von *ChsC* keinerlei Effekt hatte, wies die $\Delta chsG$ -Mutante eine verringerte Wachstumsrate, einen erhöhten Verzweigungsgrad, eine verminderte Sporulationsrate und eine verringerte Virulenz im Mäuse-Modell auf (Mellado *et al.*, 1996a). Ein weiterer interessanter Phänotyp zeigte sich nach Inaktivierung von *ChsE* (Klasse IV). Diese Stämme zeigten Schwellungen entlang der Hyphen und eine Blockierung der Sporulation, die sich durch osmotische Stabilisierung des Mediums teilweise wieder aufheben ließ (Aufauvre-Brown *et al.*, 1997). Eine komplette Reduktion der Pathogenität trat allerdings in keinem der untersuchten Fälle auf.

Noch besser untersucht als *A. fumigatus* ist *A. nidulans*. Dieser Pilz wird häufig als Modellorganismus für seinen pathogenen Verwandten angesehen. Insgesamt sind hier allerdings nur fünf *Chs*-Gene bekannt, von jedem dieser Gene liegen aber die entsprechenden knock-out Mutanten, z.T. auch Doppelmутanten vor. Da an diesem Organismus mehrere Arbeitsgruppen arbeiten, ist die Nomenklatur nicht einheitlich. Im Folgenden werden die Bezeichnungen benutzt, wie sie bei Fujiwara *et al.* (2000) veröffentlicht sind. Die Phänotypen der Mutanten variieren von unauffällig ($\Delta chsC$, $\Delta chsD$) (Fujiwara *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 1997; Motoyama *et al.*, 1994; Specht *et al.*, 1996), über leichte Defekte in der Konidienbildung ($\Delta chsA$ und Doppelmутanten $\Delta chsA/C$ und $\Delta chsA/D$) (Culp *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 1997; Yanai *et al.*, 1994), bis hin zu starken Defekten in Wachstum und Morphologie ($\Delta chsB$, $\Delta csmA$) (Borgia *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1999; Specht *et al.*, 1996; Yanai *et al.*, 1994).

Interessanterweise zählt *AnChsB* ebenso zu Klasse III wie *N. crassa ChsI* und *A. fumigatus ChsG* (s. oben). Die Gene dieser Klasse, die nur in filamentösen Pilzen vorkommt, scheinen häufiger als die der anderen Klassen eine bedeutende Rolle in der Morphogenese zu spielen. *AnChsB* wurde ursprünglich sogar als ein essentielles Gen eingestuft (Yanai *et al.*, 1994), ehe in einer späteren Arbeit gezeigt werden konnte, dass auch Isolate mit defektem *ChsB* ein – wenn auch sehr geringes – Wachstum zeigen (Borgia *et al.*, 1996). Die gebildeten

Minikolonien weisen einen sehr hohen Verzweigungsgrad und die Hyphen ein blasiges Aussehen auf. Dieser Phänotyp wird nicht durch Zugabe osmotischer Stabilisatoren aufgehoben und der Chitin-Gehalt entspricht überraschenderweise dem des Wildtyps. Es könnte also sein, dass ChsB nur einen kleinen Teil des gesamten Chitins in der Zellwand synthetisiert, dass dieser Teil aber essentiell für die Struktur der Zellwand ist (z.B. aufgrund von Quervernetzungen mit anderen Bestandteilen).

Das zweite Gen, dessen Mutagenese zu einem stark veränderten Phänotyp führt, ist *CsmA* (Fujiwara *et al.*, 1997; Specht *et al.*, 1996). Diese Mutanten weisen ebenfalls blasige Hyphen auf, außerdem unterbleibt die Bildung von Luftmycel und von Konidiophoren fast vollständig. Zusätzlich kommt es noch zur Ausbildung sogenannter intrahyphaler Hyphen, d.h. Hyphen, die innerhalb alter, abgestorbener Hyphen wachsen (Horiuchi *et al.*, 1999).

Ein sehr interessanter Aspekt dieses Gens ist das Vorhandensein hoher Homologie zu unkonventionellen Myosinen im N-terminalen Bereich des Proteins. Diese Domäne könnte eine Rolle in der Lokalisation des Enzyms oder enzymhaltiger Vesikel entlang des Zytoskeletts spielen, worauf auch Daten aus *S. cerevisiae* hinweisen, die zeigen, dass der korrekte Transport von Chs3p von Myosin (Myo2p) und Aktin abhängt (Santos & Snyder, 1997) (s. auch I.2.2). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Myosin-Domäne ist das Ergebnis, dass die Chitin Synthase-Domäne alleine nicht zur Komplementierung des mutierten Phänotyps ausreicht. Mittlerweile wurden auch aus anderen Pilzen homologe Gene isoliert (*M. grisea*, *B. graminis*, s. unten, *C. graminicola*, diese Arbeit), was darauf schließen lässt, dass es sich bei dieser Myosin-Chs-Verbindung um ein allgemein vorkommendes Phänomen handelt.

I.3.3 Chitin Synthese in pflanzenpathogenen Pilzen

I.3.3.1 Magnaporthe grisea

Der Verursacher der Reisverbräunung, *M. grisea*, ist ein ökonomisch bedeutendes Pathogen an Reis und dient in zahlreichen Untersuchungen als Modellorganismus für Pilz-Pflanzen-Interaktionen (Talbot, 1995). Die Untersuchungen über Chitin Synthesen beschränken sich allerdings im Wesentlichen auf zwei Arbeiten. In der ersten Arbeit wurden mit Hilfe von degenerierten Primern insgesamt vier Fragmente in einer Länge von 603 bp bis 773 bp isoliert (Vidal-Cros & Boccara, 1998). Diese wurden aufgrund ihrer Sequenz den

Klassen I-IV zugeordnet. Alle vier Gene werden während des Lebenszyklus von *M. grisea* exprimiert.

Die zweite Arbeit beschreibt die Isolierung von *Csm1*, einem Klasse V Chitin Synthase Gen mit Myosin Domäne, das hohe Homologie zu *CsmA* von *Aspergillus nidulans* aufweist (s. I.3.2.2) und ebenfalls während des vegetativen Wachstums exprimiert wird (Park *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen zur Funktion der einzelnen Gene liegen nicht vor.

I.3.3.2 *Blumeria graminis*

Vom Erreger des echten Mehltaus an Getreide sind bislang zwei Chitin Synthase Gene bekannt, die zu Klasse I (*Chs1*) und V (*Chs2*) gehören (Zhang & Gurr, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Beide wurden mit Hilfe degenerierter Primer isoliert, das Klasse V Gen besitzt außerdem im N-terminalen Bereich eine Myosin-Domäne, wie sie schon aus *A. nidulans* und *M. grisea* bekannt ist. Die Transkription beider Gene ist während der Bildung des primären Keimschlauchs, die von *Chs1* auch bei der Bildung des sekundären Keimschlauchs erhöht. Die Expressionsrate von *Chs1* ist dabei ca. 30mal höher als die von *Chs2*. Die Zugabe von Chitin Synthase-Inhibitoren (s. auch I.4) bewirkt ein Anschwellen der sekundären Keimschläuche und, insbesondere bei Behandlung mit Polyoxin D, ein gelegentliches Aufplatzen der Strukturen.

I.3.3.3 *Ustilago maydis*

Der Basidiomycet *U. maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands und besitzt eine zweifache wirtschaftliche Bedeutung. Zum einen kann er große Ernteverluste hervorrufen, zum anderen werden die vom Pilz hervorgerufenen Tumore in einigen Teilen Mittel- und Südamerikas als Nahrungsmittel genutzt (Valverde *et al.*, 1995). Aus *U. maydis* sind insgesamt sechs verschiedene Gene für Chitin Synthasen bekannt, verteilt auf alle fünf Klassen (Gold & Kronstad, 1994; Xoconostle-Cazares *et al.*, 1996; Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997). Für alle diese Gene wurden Inaktivierungen durchgeführt und es zeigte sich, dass es meist nur geringfügige Abweichungen in der Chitin Synthase Aktivität, dem Chitin Gehalt und der Virulenz vom Wildtyp gab. Nur die $\Delta chs5$ Mutante (Klasse IV) zeigte eine stärkere Reduktion in den genannten Eigenschaften, ohne dadurch apathogen zu werden (Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997). Auch die Doppelmutanten $\Delta chs1/chs2$, $\Delta chs3/chs4$ und $\Delta chs4/chs5$ zeigen keinen über die Einzelmutanten hinausgehenden Phänotyp (Chavez-Ontiveros *et al.*, 2000; Gold & Kronstad, 1994).

I.4 Chitin Synthese als Angriffspunkt fungizider Wirkstoffe

Aus der Tatsache, dass Chitin in der Natur weder bei Säugetieren noch bei Pflanzen, sondern nur in den Zellwänden von Pilzen und der Kutikula von Arthropoden vorkommt, erklärt sich das große Interesse an Hemmstoffen der Chitinbiosynthese. Solche Inhibitoren könnten sowohl in der Human- und Tiermedizin als auch im Pflanzenschutz als selektive Antibiotika bzw. Pestizide eingesetzt werden. Die potentielle Wirksamkeit solcher Stoffe lässt sich z.B. an Temperatur-sensitiven (ts-) Mutanten von *A. nidulans* mit Defekten in der Chitin-Synthese ansehen (Borgia & Dodge, 1992; Katz & Rosenberger, 1970). Werden diese ts-Mutanten bei der restriktiven Temperatur kultiviert, schwellen die Sporen stark an und lysieren bei der Keimung. Auch für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass mindestens ein Chitin Synthase Gen (*Chs2* oder *Chs3*, siehe auch I.3.1) für das Überleben der Zellen notwendig ist (Shaw *et al.*, 1991). Zellen, die nur *Chs2* unter der Kontrolle des GAL1 Promotors enthielten, waren lebensfähig. Wurde aber die Expression von *Chs2* durch Transfer auf Glucosemedium abgeschaltet, kam es zu einer starken Vergrößerung der Zellen und nachfolgender Lyse. Auch Ergebnisse im Humanpathogen *Candida albicans* deuten darauf hin, dass zumindest eine gewisse Menge an Chitin für das Überleben der Zellen notwendig ist, da es zunächst nicht möglich war, *CaChs1*-defiziente Mutanten zu erzeugen (Mio *et al.*, 1996). Dies gelang erst unter Verwendung eines regulierbaren Promotors (MRP1). Wie erwartet kam es nach Abschalten des Promotors zum Verlust der Lebensfähigkeit der betroffenen Zellen. Diese entwickelten sich zwar zunächst noch weiter, es kam aber zu einer fehlenden Septierung und damit zu Pseudohyphenwachstum. Im weiteren Verlauf kam es dann zu blasenartigen Ausstülpungen und zur Lyse der Zellen (Munro *et al.*, 2001).

Zu den bekanntesten und bestuntersuchten CHS-Inhibitoren gehören die Polyoxine und Nikkomycine (Debono & Gordee, 1994). Diese Nucleosid-Tri- bzw. Dipeptide werden natürlicherweise von verschiedenen *Streptomyces* spp. synthetisiert und wurden schon vielfach für biochemische Untersuchungen an Chitin-Synthase eingesetzt. Diese Untersuchungen zeigen, dass es sich dabei um eine kompetitive Hemmung handelt, die sich durch die strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat UDP-GlcNAc erklären lässt (Abb. 1.1).

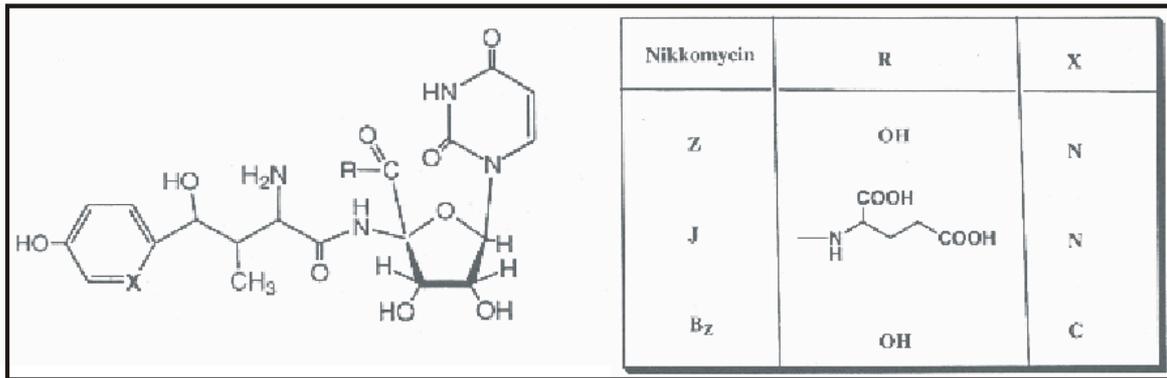


Abb. 1.1: Struktur der Chitin Synthase-Inhibitoren aus der Gruppe der Nikkomycine

Obwohl diese Substanzen *in vitro* meist eine sehr gute Wirkung haben, ist ihre Effektivität *in vivo* häufig stark eingeschränkt, bzw. variiert stark bei unterschiedlichen Organismen (Tariq & Devlin, 1996). Dies könnte mehrere Ursachen haben:

Zum einen ist offensichtlich die Sensitivität der verschiedenen Chs-Enzyme in einem Organismus stark unterschiedlich. Während Chs3p in Hefe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Sensitivität gegenüber Nikkomycin Z aufweist, ist Chs2p nahezu unempfindlich (Gaughran *et al.*, 1994). Dies erklärt auch die Unempfindlichkeit von Wildtyp-Zellen gegen diese Substanz, da Chs2p allein in der Lage ist, das Wachstum aufrechtzuerhalten (siehe I.3.1).

Zum anderen liegt der Wirkort dieser Komponenten intrazellulär, d.h. sie müssen die Plasmamembran überwinden. Dies geschieht mit Hilfe normaler Peptidtransport-Systeme, da sich die Aufnahme durch die Zugabe von Peptiden hemmen lässt (Yadan *et al.*, 1984). Zudem sind die Inhibitoren dann auch dem Angriff intrazellulärer Proteasen ausgesetzt. Es wurde versucht, eine verbesserte Wirkung gegen *C. albicans* zu erreichen, indem eine weitere Aminosäure an Polyoxin D gekoppelt wurde. Dies verbesserte in der Tat den Transport in die Zelle, wo dann durch Proteolyse die wirksame Komponente freigesetzt werden sollte. Leider wurde aber eine verminderte Wirksamkeit festgestellt (Krainer *et al.*, 1991).

Trotz großer Anstrengungen bei der Suche nach und Synthese von verwandten Substanzen (Zhang & Miller, 1999), ist es bislang nicht gelungen, ein zuverlässig wirksames Mittel auf der Basis dieser Substanzen zu entwickeln. Aus diesem Grund wurden weitere Überlegungen angestellt, die erstens auf die Kombination von CHS-Inhibitoren mit anderen antifungal wirkenden Komponenten zielen, zweitens nach strukturell nicht verwandten CHS-Inhibitoren

suchen und drittens von Chitin Synthasen verschiedene Angriffspunkte in der Chitin Synthese in Betracht ziehen.

So wurden die CHS-Inhibitoren z.B. gemeinsam mit Glucan Synthase-Inhibitoren (Papulacandin B, LY 303366) und Azolen eingesetzt, was in den meisten Fällen zu einer synergistischen Wirkung führte (Hector & Braun, 1986; Hector & Schaller, 1992; Stevens, 2000). Breit angelegte Wirkstoffscreens führten außerdem zur Entdeckung von weiteren Substanzen, die sich in ihrer Wirkweise von den Nucleosid-Peptiden unterscheiden und z.T. spezifisch auf bestimmte CHS Isozyme wirken (Sudoh *et al.*, 2000).

Weitere Angriffspunkte für Inhibitoren sind die Schritte, die zur Synthese des Substrats UDP-GlcNAc führen, was den positiven Effekt hätte, das dadurch alle Chitin Synthasen gleichermaßen betroffen wären. Dass dies effektiv ist, zeigen Untersuchungen an Mutanten von *S. cerevisiae* und *C. albicans*, die in verschiedenen Genen dieses Synthesewegs defekt sind (Mio *et al.*, 1998; Mio *et al.*, 1999; Mio *et al.*, 2000). Alle diese Mutationen sind letal, können aber teilweise durch Zugabe des Produktes der entsprechenden Enzymreaktion wieder komplementiert werden. Allerdings sind auch die „stabilisierten“ *C. albicans* Mutanten nicht mehr in der Lage, Mäuse zu infizieren (Mio *et al.*, 2000). Auch die bereits oben erwähnten Mutanten von *A. nidulans* haben vermutlich Defekte in frühen Syntheseschritten des Substrats und können nur noch auf stabilisierten Medien wachsen, bzw. können durch Zugabe von GlcNAc komplementiert werden (Borgia & Dodge, 1992; Katz & Rosenberger, 1970). Bei einem der betroffenen Gene (*orlA*) handelt es sich um einen Teil des Glutamin:Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase Enzymkomplexes (Borgia, 1992). Bislang wurde allerdings nur eine Substanz, nämlich Tetain (Bacilysin) gefunden, die genau dieses Enzym hemmt (Milewski *et al.*, 1986), und dadurch antifungal wirkt. Diese Substanz, von *Bacillus subtilis* produziert, besitzt aber auch antibiotische Eigenschaften gegen Bakterien und menschliche Zellen und ist deshalb für einen spezifisch antifungalen Einsatz nicht geeignet (Woynarowska *et al.*, 1985).

I.5 Ziel der Arbeit

Die pilzliche Zellwand erfüllt, wie oben beschrieben, wichtige strukturelle Aufgaben. Bei *C. graminicola* kommt insbesondere bei der Ausbildung von Infektionsstrukturen, namentlich Appressorien, der Stabilität der Zellwand eine entscheidende Bedeutung zu. Im Appressorium wird ein sehr hoher Turgordruck generiert. Durch die Stabilität der Zellwand im oberen Bereich des Appressoriums wird die daraus resultierende Kraft gezielt auf die

Penetrationspore gelenkt. Sind Bereiche der Zellwand außerhalb der Penetrationspore nicht stabil genug, könnte die dort einwirkende Kraft zu einer Schädigung der Zellwand, gegebenenfalls sogar zu einer Zerstörung des Appressoriums führen.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Defekte in der Chitin Synthese, bedingt durch Inhibition der enzymatischen Aktivität oder durch gezielte Inaktivierung von Chitin Synthase-Genen, zu einer verminderten Stabilität der Appessorienwand und damit zu einer Verminderung der Pathogenität führen würden.

Des weiteren sollte untersucht werden, ob bestimmte Gene bestimmte Funktionen innerhalb des Lebenszyklus ausfüllen, also z.B. nur in vegetativen Hyphen, während der Sporogenese oder *in planta* exprimiert werden.

Für alle diese Untersuchungen ist *C. graminicola* ein sehr gut geeigneter Organismus. Er lässt sich einfach auf Nährmedien kultivieren und produziert dabei große Mengen asexueller Sporen, er differenziert Infektionsstrukturen auch auf künstlichen Oberflächen (z.B. Objektträgern) und ist nicht zuletzt stabil transformierbar (Epstein *et al.*, 1998; Panaccione *et al.*, 1988; Vaillancourt & Hanau, 1994).

II Material und Methoden

II.1 Biologisches Material

II.1.1 Pilzmaterial und *in vitro* Infektionsstrukturen

II.1.1.1 Isolate und Kulturbedingungen

Isolat M2 von *Colletotrichum graminicola* wurde als Wildtyp verwendet (Panaccione *et al.*, 1988). Die Kultivierung erfolgte auf Haferflockenagar (Rezepte aller Nährmedien finden sich im Anhang unter Punkt VII.1) bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwarzlicht (Röhrentyp: Philipps TLD36W/08), um die Konidienbildung zu induzieren. Flüssigkulturen wurden mit Kompletmedium (CM, modifiziert nach Leach *et al.*, 1982) angesetzt und unter Schütteln (110 rpm) bei 21 °C inkubiert.

Die ChsC-defizienten Isolate wurden in CM-Saccharose-Medium (CM + 0,5 M Saccharose) bzw. auf CM-Saccharose-Agar kultiviert.

Eine vollständige Liste aller in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Isolate befindet sich im Anhang (VII.2).

II.1.1.2 Differenzierung von *in vitro* Infektionsstrukturen

Konidien von *C. graminicola* wurden mit H₂O_{dest} von Agarplatten abgewaschen und in einer stark verdünnten Kartoffeldextrose-Lösung (48 mg/l; Difco Laboratories GmbH, Augsburg) auf ca. 10⁴ Sporen/ml eingestellt. Davon wurden 20-100 µl Tropfen auf Polystyrol-Petrischalen oder auf Stücke von Tageslichtprojektor-Folien (Nr. 3558, Avery Dennison Zweckform, Holzkirchen) gesetzt, die zuvor gründlich mit H₂O_{dest} gewaschen wurden. Die Sporen wurden in einer feuchten Kammer inkubiert, und nach 20-24 Stunden wurden die Infektionsstrukturen im Mikroskop betrachtet.

II.1.2 Pflanzenmaterial und Infektionsversuche

Maispflanzen (*Zea mays* cv. Mutin) wurden im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen angezogen.

Für Infektionsversuche wurden die jüngsten voll ausgebildeten Blätter von 14-21 Tage alten Pflanzen abgeschnitten und mit 10 µl-Tropfen einer Sporensuspension (10⁵-10⁶/ml,

siehe II.1.1.2) inokuliert. Die Blätter wurden bei 100 % Luftfeuchte inkubiert und die Entwicklung von Symptomen makroskopisch und mikroskopisch über mehrere Tage hinweg verfolgt.

Für die Inokulation von ganzen Pflanzen wurde der Sporensuspension 0,01 % (v/v) Tween 20 zugesetzt und die Pflanzen mit einem Feinzerstäuber besprüht, bis alle Blätter mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm benetzt waren. Die Pflanzen wurden dann für 24 h bei 100 % Luftfeuchte inkubiert und anschließend wieder unter normalen Bedingungen kultiviert.

Da die ChsC-defizienten Isolate keine Konidienlager ausbildeten, wurden die Infektionsversuche hier mit kleinen Agarstückchen durchgeführt, die vom Rand einer wachsenden Kolonie gewonnen wurden. Die Agarstückchen wurden zusätzlich noch mit 5-10 µl einer 0,5 M Saccharose-Lösung überschichtet, um das Wachstum der Mutanten zu gewährleisten.

Bei einigen Versuchen wurden die Blätter vor der Inokulation mit einer sterilen Präpariernadel verletzt.

II.1.3 Anzucht und Kultur von Bakterien

Escherichia coli (Stämme XL1BlueMRF', DH10β und TOP10) wurde bei 37 °C auf LB-Platten (10 g/l Bactotrypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Agar-Agar) kultiviert. Flüssigkulturen in LB-Medium (wie oben, jedoch ohne Agar-Agar) wurden aus Einzelkolonien angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Für kürzere Zeiträume (bis max. 4 Wochen) wurden die Platten bei 4 °C gelagert, für eine längere Aufbewahrung wurde eine Flüssigkultur auf 10 % Glycerin eingestellt und bei -70 °C eingefroren. Transformierte Bakterien mit einer Ampicillin-Resistenzkassette wurden wie oben beschrieben kultiviert, nur dass den Medien 100 µg/ml Ampicillin zugefügt wurde.

II.2 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Fisher Scientific (Schwerte) bezogen. Auf alle weiteren Bezugsquellen für Enzyme, Kits oder spezielle Reagenzien wird an der entsprechenden Stelle im Text verwiesen.

Synthetische Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen aller in dieser Arbeit benutzten Primer finden sich im Anhang (VII.3).

II.3 Molekularbiologie

II.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

II.3.1.1 Präparation genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach dem Protokoll von Döbbeling *et al.* (1997). Dazu wurden ca. 0,5 g Pilzmycel unter flüssigem Stickstoff zerrieben, in 800 µl Extraktionspuffer (7 M Harnstoff, 2 % SDS, 5 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und mit 800 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1; QBiogene, Heidelberg) gemischt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation (5 min, 20000 g) getrennt und die obere wässrige Phase nochmals mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 6800 g) sedimentiert. Das Pellet wurde dann in 700 µl Puffer 2 (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen und die RNA durch Zugabe von 3,5 µl RNase A (10 mg/ml, hitzebehandelt; Roche Diagnostics, Mannheim) verdaut (30 min, 37 °C). Der Verdau wurde durch Zugabe von 17,5 µl 20 % SDS gestoppt und anschließend ein Proteinase K Verdau mit 10 µl einer 14-22 mg/ml Proteinase K Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt (60 min bei 60 °C). Die Proben wurden anschließend mit 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert, die DNA wieder mit 1 Volumen Isopropanol gefällt und zentrifugiert (10 min, 20000 g), mit 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 20000 g), im Vakuum-Zentrifugalverdampfer („Speed-vac“) getrocknet und schließlich in 50 µl 0,1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

II.3.1.2 Schnelle Präparation genomischer DNA zum Einsatz in der PCR

Diese Methode wurde erarbeitet, um mit möglichst geringem Arbeitsaufwand und möglichst hoher Zuverlässigkeit eine große Zahl von *Colletotrichum*-Isolaten nach einer Transformation untersuchen zu können. Dazu wurden 500 µl Komplettmedium in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit etwas Pilzmycel angeimpft und ungefähr 1 Woche bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstandene Mycel wurde durch Zentrifugation (5 min, 14000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge) gesammelt, mit 0,5 ml H₂O_{dest} gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 50 µl 0,1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Das Mycel wurde dann mit einem Mikropistill zerkleinert und es wurden weitere 450 µl 0,1x TE-Puffer zugegeben. Von dieser Präparation wurden 0,5-1 µl für einen 10 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

II.3.1.3 Präparation von Plasmid- und Cosmid-DNA

1,5-5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Um für Sequenzierungen die höchstmögliche Reinheit zu erhalten, wurde der optionale Waschschrift mit PB-Puffer grundsätzlich durchgeführt und nach Zugabe des PE-Waschpuffers eine 2-5minütige Inkubation eingefügt.

II.3.1.4 Präparation von Gesamt-RNA

Für die RNA-Isolierung wurden zum Schutz vor RNasen alle Lösungen mit DEPC behandelt, Kunststoff-Einmalartikel (Pipettenspitzen, Eppendorfreaktionsgefäße) mit DEPC-H₂O_{dest} gespült und Glaswaren für 3 h bei 200 °C gebacken. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski & Sacchi (1987).

500 mg Mycel bzw. Blattmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und in 5 ml Extraktionspuffer (= Lösung D: 4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,5 % (w/v) Sarcosyl, 0,1 M β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Für die Präparation aus Apessorien wurden diese auf 2 DINA4-Kunststofffolien wie unter II.1.1 beschrieben induziert, mit der Kante eines Lineals abgeschabt und in insgesamt 5 ml Lösung D aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte mit einem Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Staufen). Anschließend wurden nacheinander 0,5 ml 2 M Na-Acetat, pH 4,0, 5 ml Phenol und 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und 10 sec gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (20 min, 10000 g, 4 °C), die wässrige Phase mit 5 ml Isopropanol versetzt und die RNA für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Danach wurde nochmals 20 min bei 10000 g zentrifugiert (4 °C), das Pellet in 0,8 ml Lösung D gelöst, in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die RNA abermals mit 0,8 ml Isopropanol gefällt (1 h, -20 °C). Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 20000 g) wurde das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, an der Luft oder in der Speed-vac getrocknet und schließlich in 100 μ l H₂O_{dest} resuspendiert. Da die Pellets meist sehr schlecht löslich waren, wurden die Präparationen noch 15 min bei 65 °C inkubiert und die RNA anschließend eingefroren.

II.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

II.3.2.1 DNA-Agarose Gele

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde 0,8 - 2 % (w/v) Agarose (Seakem[®] LE-Agarose; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) in TAE-Puffer (40 mM Tris, pH 8,3, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA) gegeben, durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und in einen Träger gegossen. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, auf des Gel aufgetragen und in TAE-Puffer bei konstanter Spannung (80–140 V) getrennt. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 15–45 min gefärbt und das Ergebnis auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 320 nm mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (AlphaImager, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) dokumentiert.

II.3.2.2 Denaturierende RNA-Agarose Gele

Agarose wurde in einer Konzentration von 1 % (w/v) in RNA-Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, pH 7,0, 1 mM EDTA; DEPC-behandelt) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, nach Abkühlen auf 50 – 60 °C mit 1,9 % (v/v) Formaldehyd versetzt und in einen Träger gegossen. 10–15 µg Gesamt-RNA (in 3–5 µl H₂O_{dest}) wurden mit einem vierfachen Volumen Probenpuffer (55 % (v/v) Formamid, 10 % (v/v) 10x RNA-Laufpuffer, 6,5 % (v/v) Formaldehyd, 7 % (v/v) H₂O_{dest} (DEPC-behandelt), 7 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt, 15 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 3 V/cm. Nach dem Lauf wurde das Gel auf dem UV-Tisch betrachtet.

II.3.3 Hybridisierungen

II.3.3.1 Herstellung von Hybridisierungs-Sonden

Die eingesetzten Sonden wurden mittels einer Standard-PCR (s. II.3.4) mit Digoxigenin (DIG) markiert. Dazu enthielten die Reaktionsansätze einen speziellen DIG-dNTP-Mix, der sich wie folgt zusammensetzte: je 0,2 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,13 mM dTTP und 0,07 mM DIG-dUTP (alkali-labil; Roche Diagnostics, Mannheim). Als *Template* diente Plasmid-DNA mit entsprechendem *Insert*. Der Erfolg der Markierung wurde anhand des veränderten Laufverhaltens im Agarose-Gel überprüft.

II.3.3.2 Southern Blots

Transfer

Genomische DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig verdaut (siehe II.3.5.1) und im 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Um einen besseren Transfer der größeren Fragmente zu erreichen, wurde die DNA depuriniert (20 min unter Schütteln in 0,25 M HCl inkubieren), was zu Strangbrüchen führt, und anschließend neutralisiert (20 min in 0,4 M NaOH). Die DNA wurde dann über einen alkalischen, abwärts gerichteten Kapillartransfer für 1,5 h auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) geblottet (Brown, 1999). Die Transfereinheit war dabei wie folgt aufgebaut (von unten nach oben):

Zunächst ein ca. 3 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern, etwas größer als das Gel zugeschnitten, darauf 5 Stücke Filterpapier (Whatman 3MM) in derselben Größe, wovon das oberste in Transferpuffer (0,4 M NaOH) getränkt war und anschließend die Membran, ebenfalls in Puffer angefeuchtet. Das Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt, darauf kamen 3 angefeuchtete Filterpapiere in Gelgröße und obenauf 2 größere Filterpapiere, die die Verbindung zwischen der Transfereinheit und dem danebenstehenden Pufferreservoir herstellten.

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Neutralisierung kurz in 2x SSC (SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0) geschwenkt und an der Luft getrocknet. Eine weitere Fixierung war nicht nötig, da die DNA bereits durch die alkalischen Bedingungen während des Transfers kovalent an die positiv geladene Membran gebunden war.

Hybridisierung

Zunächst wurde für 1-2 h eine Prähybridisierung mit Hybridisierungspuffer [5x SSC, 0,1 % (w/v) N-Lauroyl-sarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 1 % Blocking Reagens (Roche Diagnostics, Mannheim)] bei Hybridisierungstemperatur (meist 65 °C) durchgeführt, anschließend die denaturierte Sonde (10 min, 100 °C) in Hybridisierungspuffer zugegeben und über Nacht in einem Hybridisierungs-Inkubator (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 2mal 5 min bei RT mit 2x Waschlösung (2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) und 2mal 15 min bei Hybridisierungstemperatur mit 0,5x Waschlösung (0,5x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen.

Nachweis der gebundenen Sonde

Die Membran wurde zunächst kurz in Waschpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,3 % (v/v) Tween 20) äquilibriert und dann 30-60 min blockiert (1 % Blocking

Reagens in Waschpuffer). Anschließend folgte eine Inkubation für 30 min in Antikörperlösung (1:10000 anti-DIG-AP-Fab-Fragmente (Roche Diagnostics, Mannheim) in Blockierungslösung). Überschüssiger Antikörper wurde durch 2 x 15 min Waschen mit Waschpuffer entfernt, die Membran dann kurz in Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl) geschwenkt und zwischen zwei Plastikfolien (Roth, Karlsruhe) mit dem Substrat CSPD (1 % (v/v) in Detektionspuffer; Roche Diagnostics) 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Substrat wird unter Lichtemission von der an den Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase umgesetzt (Chemilumineszenz). Die Membran wurde luftblasenfrei zwischen den Folien eingeschweißt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgelegt. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Stärke des Signals. Der Film wurde in einem Röntgenfilmentwicklungsgerät (Optimax TR, MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

II.3.3.3 Kolonie-Hybridisierung

Diese Methode wurde zum *Screening* einer genomischen DNA-Bank von *C. graminicola* eingesetzt (s. auch II.4.1.1). Zunächst wurde eine runde Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) auf eine LB_{Amp}-Platte aufgelegt. Darauf wurden die Bakterien in einer Dichte ausplattiert, welche die Unterscheidung von Einzelkolonien möglich machte (ca. 2000 cfu/Platte). Anschließend wurden Replikas hergestellt, indem eine neue angefeuchtete Membran zwischen zwei Filterpapieren auf die mit Kolonien bewachsene Membran aufgepresst wurde. Nachdem auch auf den Replikas Kolonien zu erkennen waren, wurden sie für die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wurden die Membranen kurz auf trockenes Filterpapier (Whatman 3MM) geblottet und für 15 min auf mit Denaturierungslösung (0,5 NaOH, 1,5 M NaCl) getränktes Filterpapier gelegt (Kolonieseite nach oben). Dasselbe erfolgte für 15 min auf Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl) und für 10 min auf 2x SSC.

Anschließend wurde die DNA durch Backen (30 min, 80 °C) fixiert. Nach dem Backen erfolgte eine einstündige Behandlung mit Proteinase K (2 mg/ml in 2x SSC; Roche Diagnostics, Mannheim) bei 37 °C. Danach wurde die Membran zwischen zwei mit H₂O_{dest} angefeuchtete Filterpapiere gelegt und eventuell vorhandene Agar- und zelluläre Reste durch Überrollen mit einer Glasflasche entfernt.

Die nun anschließende Hybridisierung und Detektion erfolgte wie beim Southern Blot (II.3.3.2) beschrieben.

II.3.4 PCR-Anwendungen

II.3.4.1 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit den Thermocyclern PTC-100 und PTC-150 der Fa. MJ Research (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Als Standardenzym wurde die Taq-Polymerase von Qiagen (Hilden) mit dem beigegefügt Puffer eingesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand in der Regel aus 10-20 μl in 0,2 ml PCR-Gefäßen und setzte sich wie folgt zusammen:

1x Reaktionspuffer (inkl. 1,5 mM MgCl_2)
 je 0,2 mM der vier dNTPs
 0,5 μM Primer 1
 0,5 μM Primer 2
 0,02 U/ μl Taq-Polymerase
 Template DNA
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Alle Standard-PCR-Programme leiteten sich von folgendem Schema ab:

1 initiale Denaturierung	2-5 min	95 °C
2 Denaturierung	20 sec	94 °C
3 Annealing	30 sec	T_{opt}
4 Elongation	20 sec - 3 min	72 °C
5	25-30 Zyklen der Schritte 2 bis 4	
6 Abschluß-Elongation	5 min	72 °C
7 Abkühlen	∞	4 °C

Die Annealingtemperatur lag meist 2-4 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer (gewöhnlich zwischen 55 °C und 62 °C). Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments und betrug ca. 1 min/kb.

Die optimalen Bedingungen wurden durch Variation der Parameter Annealingtemperatur, MgCl_2 -Konzentration, DNA-Konzentration und Zyklenzahl empirisch ermittelt. Bei PCRs mit degenerierten Primern wurde die Primerkonzentration auf je 2 μM erhöht.

II.3.4.2 Expand-PCR

Die PCR von Fragmenten >3 kb erfordert besondere Versuchsansätze, da die Taq-Polymerase solche Fragmente nicht mehr mit ausreichender Effizienz amplifiziert. Aus diesem Grund wurde hierfür das Expand™ Long Template PCR-System von Roche Diagnostics (Mannheim) eingesetzt. Dabei wird ein Mix aus Taq-Polymerase und einer *proofreading*-Polymerase (eine Polymerase mit 3'-5' Exonuklease-Aktivität) eingesetzt. Die Versuchsansätze unterschieden sich wie folgt vom Standardansatz: Der 1x Puffer enthielt 1,75 mM MgCl₂, die dNTPs wurden in einer Konzentration von je 350 µM eingesetzt, die Primer in einer Konzentration von je 0,3 µM. Der Enzym-Mix wurde nach Angaben des Herstellers benutzt und es wurde folgendes Programm durchgeführt:

1 initiale Denaturierung	2 min	94 °C
2 Denaturierung	10 sec	94 °C
3 Annealing	30 sec	T _{opt}
4 Elongation	2-4 min	68 °C
5	10 Zyklen der Schritte 2 bis 4	
6 Denaturierung	10 sec	94 °C
7 Annealing	30 sec	T _{opt}
8 Elongation	2-4 min + 20 sec/Zyklus	68 °C
9	15-20 Zyklen der Schritte 6 bis 8	
10 Abschluß-Elongation	7 min	68 °C
11 Abkühlen	∞	4 °C

Für die Optimierung der Expand-PCR gilt dasselbe wie für die Standard-PCR.

II.3.4.3 Touchdown-PCR

Bei dieser Art der PCR wird zunächst ein Gradient von Annealingtemperaturen durchlaufen, beginnend mehrere Grad über der Schmelztemperatur der Primer. Dies soll die Bildung unspezifischer Nebenprodukte am Beginn der PCR verringern und zu einer Anreicherung der spezifischen Produkte führen (Don *et al.*, 1991). Anschließend werden noch mehrere Zyklen unter Standard-Bedingungen durchgeführt. Das Programm sah dementsprechend wie folgt aus:

1 initiale Denaturierung	2 min	95 °C
2 Denaturierung	20 sec	94 °C
3 Annealing	30 sec	$T_{\max} - 1$ °C/Zyklus
4 Elongation	0,5-2 min	72 °C
5	10-15 Zyklen der Schritte 1 bis 3	
6 Denaturierung	20 sec	95 °C
7 Annealing	30 sec	T_{opt}
8 Elongation	2-4 min	72 °C
9	20-25 Zyklen der Schritte 6 bis 8	
10 Abschluß-Elongation	7 min	72 °C
11 Abkühlen	∞	4 °C

II.3.4.4 Inverse PCR

Die inverse PCR dient zur Amplifikation unbekannter Sequenzen auf beiden Seiten einer bekannten Sequenz (Pang & Knecht, 1997). Dazu wurden zunächst 2 µg genomische DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (3-4 verschiedene Ansätze) verdaut (s. II.3.5.1) und anschließend ligiert (s. II.3.5.4), so dass zirkuläre Produkte entstanden. Davon wurden unterschiedliche Mengen (5-20 ng/µl) in Expand-PCR-Ansätze eingesetzt (s. II.3.4.2). Die dabei benutzten Primer wiesen von dem bekannten Sequenzabschnitt nach außen und ermöglichten so die Vermehrung unbekannter Abschnitte. Man kann mit dieser Methode auch gezielt Abschnitte auf der 5'- oder 3'-Seite der bekannten Sequenz amplifizieren, indem man ein Restriktionsenzym wählt, für welches bereits eine Schnittstelle im bekannten Bereich vorhanden ist. Es werden dann nur solche unbekanntes Abschnitte vermehrt, die auf derselben Seite der Schnitstelle liegen wie die Primer. Beide Möglichkeiten wurden zur Isolierung von *ChsC*-Sequenzabschnitten eingesetzt (s. II.4.1.2).

II.3.4.5 RT-PCR

Die RT-PCR dient dem Nachweis der Transkription eines Gens, also dem Vorhandensein einer spezifischen mRNA. Dazu wird zunächst mit einer Reversen Transkriptase ein zur mRNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert und anschließend eine Standard-PCR durchgeführt. Um sicherzustellen, dass keine DNA amplifiziert wird, die als Verunreinigung

in der RNA-Präparation vorliegen kann, wurden zwei Maßnahmen ergriffen. Zum einen wurden nach Möglichkeit Primer gewählt, die auf beiden Seiten eines Introns binden. Dadurch unterscheiden sich die Produkte, die von mRNA bzw. von DNA als *Template* erzeugt werden, in ihrer Größe. Zum anderen wurde vor der eigentlichen Reaktion ein DNase-Verdau durchgeführt:

Dazu wurden 2,5 µg Gesamt-RNA, 2,5 U RNase-freie DNase (Promega GmbH, Mannheim), 1x Reaktionspuffer und H₂O_{dest} (DEPC-behandelt) in einem Volumen von 10 µl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Darauf wurde 1 µl Stop-Lösung zugegeben und weitere 10 min bei 65 °C inkubiert.

Die RT-PCR erfolgte dann mit dem OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden). Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

1x Reaktionspuffer (inkl. 2,5 mM MgCl₂)
 je 0,4 mM dNTPs
 0,6 µM Primer 1
 0,6 µM Primer 2
 0,4 µl Enzym-Mix (Omniscrypt™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptase
 sowie HotStar Taq™-Polymerase)
 0,5 – 1,0 µl DNase verdaute RNA (ca. 115 – 230 ng)
 H₂O_{dest} ad 10 µl

Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert, der Thermocycler auf 50 °C vorgeheizt und folgendes Programm durchlaufen:

1 Reverse Transkription	30 min	50 °C
2 initiale Denaturierung	15 min	95 °C
3 Denaturierung	20 sec	94 °C
4 Annealing	30 sec	T _{opt}
5 Elongation	15-60 sec	72 °C
6	25-35 Zyklen der Schritte 3 bis 5	
7 Abschluß-Elongation	10 min	72 °C
8 Abkühlen	∞	4 °C

II.3.5 Klonierungstechniken

II.3.5.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsenzyme und Puffer stammen, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot). Die Restriktionsverdau wurden in Volumina von 10 – 200 µl durchgeführt. Dazu wurden die DNA, eine entsprechende Menge 10x Puffer, das/die Enzym/e und H₂O_{dest} auf Eis gemischt und anschließend bei der für das/die Enzym/e optimalen Temperatur (meist 37 °C) für 1 – 16 h inkubiert. Für einen vollständigen Verdau wurde dabei die Enzymmenge und die Inkubationsdauer so gewählt, dass das Produkt aus Enzymaktivität [units] und Zeit [h] größer oder gleich der 20fachen DNA-Menge [µg] war. Nach dem Verdau wurde/n das/die Enzym/e durch eine 20minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert (sofern möglich).

II.3.5.2 Modifikation der Enden verdauter DNA

Für einige Klonierungen war es notwendig, die überstehenden Enden nach dem Restriktionsverdau zu modifizieren, um entweder kompatible überstehende (mit 1-2 komplementären Basen) oder glatte Enden zu erzeugen.

Bei 5'-Überhängen erfolgte eine Auffüllreaktion entweder mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (2 units/Ansatz; Roche Diagnostics, Mannheim) oder mit der T4 DNA-Polymerase (1-2 units/Ansatz; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und den dazu notwendigen dNTPs (je 0,1 mM). Für partielle Auffüllreaktionen wurden nur die Nukleotide zugegeben, die bei der Reaktion benötigt wurden. Bei 3'-Überhängen wurden die überstehenden Nukleotide durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der T4 DNA Polymerase abgebaut. Die Enzyme und Nukleotide wurden den Restriktionsansätzen ohne weitere Zugabe von Puffer beigemischt. Die Reaktionsbedingungen waren 30 min bei 30 °C und 10 min bei 75 °C (Inaktivierung) für das Klenow-Fragment bzw. 20 min bei 11 °C und 10 min bei 75 °C für die T4 DNA Polymerase.

II.3.5.3 Dephosphorylierung

Um die Religation des Vektors zu verhindern, wurde in vielen Fällen eine Dephosphorylierung durchgeführt. Dazu wurde den Ansätzen pro 100 ng verdauter Vektor-DNA 1 unit Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP; Roche Diagnostics, Mannheim) und

Dephosphorylierungspuffer (1x) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase wurde dann durch eine 10minütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert.

II.3.5.4 Ligationen

Grundsätzlich wurden für Ligationen Vektor- und *Insert*-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Die 10-20 µl Ansätze bestanden aus 30-100 ng Vektor-DNA, einer 3- bis 5-fachen Menge *Insert*-DNA, 1x Ligase-Puffer und 1-2 WeissU T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Bei überstehenden Enden (*sticky ends*) erfolgte die Inkubation für 1-4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Bei glatten Enden (*blunt ends*) wurde der Ligationsansatz zunächst 4 h bei 16 °C und dann mindestens 12 h bei 4 °C inkubiert. Für die anschließende Transformation (s. II.3.7.2) wurde 1/5 bis die Hälfte des Ligationsansatzes eingesetzt. In einigen Fällen erfolgte die Ligation mit dem Rapid DNA Ligation Kit von Roche Diagnostics (Mannheim). Die Ansätze wurden dabei nur 5-30 min bei RT inkubiert und gleich anschließend für die Transformation eingesetzt.

II.3.5.5 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerase erzeugt wurden, besitzen häufig einen A-Überhang am 3'-Ende (Clark, 1988). Für ihre Klonierung wurden 2 Methoden angewandt. Die erste bestand in der Erzeugung glatter Enden mit Hilfe der T4-DNA Polymerase (siehe II.3.5.2) und nachfolgender *blunt end*-Ligation.

Die andere Methode nutzte den TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen (Groningen, Niederlande). Der dabei mitgelieferte Vektor (pCR[®]4-TOPO[®] bzw. die ältere Version pCR[®]2.1-TOPO[®]) ist bereits linearisiert und besitzt 3'-T-Überhänge. Die Verknüpfung von Vektor und *Insert* erfolgt über die Aktivität einer Topoisomerase. Die Transformation erfolgte in die ebenfalls mitgelieferten *One Shot*[®] TOP10 kompetenten *E. coli* Zellen. Das Vorgehen entsprach dabei den Anleitungen des Herstellers.

II.3.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Sequenzierungen erfolgten auf einem ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). PCR-Produkte wurden vor der Sequenzreaktion mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt, Plasmid- und Cosmid-Präparationen erfolgten mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (beides von Qiagen GmbH, Hilden). Die Sequenzierung

beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977), wobei hier Fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide zum Einsatz kamen. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

2-4 μl *Ready Reaction Mix* (enthält AmpliTaq[®] FS DNA Polymerase, dNTPs, BigDye-ddNTPs und Puffer)
 5 pmol Sequenzierprimer
 DNA: 30-50 ng PCR-Produkt
 oder 200-250 ng Plasmid
 oder 400-500 ng Cosmid
 ad 10 μl H₂O_{bidest}

Das PCR Programm (*cycle sequencing*) bestand aus folgenden Schritten:

1 Denaturierung	10 sec	96 °C
2 Annealing	5 sec	45-60 °C
3 Elongation	4 min	60 °C
4	25-30 Zyklen der Schritte 1 bis 3	

Bei der Sequenzierung von Cosmiden wurden die Ansätze zunächst ohne den *Ready Reaction Mix* 5 min bei 96 °C denaturiert, dann der Mix zugegeben und das Programm wie oben durchgeführt.

Nach Ende des Programms wurden die Ansätze mit H₂O_{dest} auf 100 μl aufgefüllt, 10 μl 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 250 μl 100 % Ethanol zugefügt und 15 min bei 20000 g zentrifugiert. Anschließend wurde mit 250 μl 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 min zentrifugiert, die Pellets 5 min in der Speed-vac getrocknet und in 20 μl TSR-Puffer (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen. Nach einer 2-minütigen Denaturierung (90 °C) und schnellem Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze in Probengefäße überführt und diese mit Septen verschlossen. Die Handhabung des Geräts erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Die Sequenzauswertung und Bearbeitung erfolgte mit der mitgelieferten Software (Sequencing Analysis, Sequence Navigator) von Applied Biosystems bzw. mit dem Lasergene99-Programmpaket der DNASTAR Inc. (Madison, U.S.A.).

Homologievergleiche (BLASTX, BLASTN; Altschul *et al.*, 1997) und Datenbankrecherche erfolgten über die Internetseite des NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Vorhersagen über die Proteinstruktur (Vorhandensein von Signalpeptiden, mögliche Transmembrandomänen)

erfolgten über den Service des Center for Biological Sequence Analysis der Technischen Universität Dänemark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

II.3.7 Transformationstechniken

II.3.7.1 Transformation von *C. graminicola*

Für die Transformation von *C. graminicola* liegen mehrere Protokolle vor (Epstein *et al.*, 1998; Panaccione *et al.*, 1988; Rasmussen *et al.*, 1992; Vaillancourt & Hanau, 1994). Das vorliegende Verfahren orientiert sich weitestgehend am Protokoll von Epstein *et al.* (1998), es wurden aber einige Modifikationen eingeführt.

Sporen von Haferflockenagar-Platten wurden mit H₂O_{dest} abgewaschen. Mit dieser Sporensuspension wurden 100 ml Komplettmedium (siehe II.1.1) in einer Konzentration von ca. 10⁶/ml angeimpft. Die Kultur wurde anschließend ohne Schütteln bei Raumtemperatur für 6-8 Tage inkubiert. Alternativ wurde ein Medium bestehend aus 0,5 M Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt mit der gleichen Sporenmenge beimpft und 3 Tage bei 21°C und 110 rpm geschüttelt.

Die Kultur wurde dann durch 2 Lagen Nesseltuch (*cheesecloth*) filtriert und das Filtrat 10 min bei 4260 g und 4 °C zentrifugiert, so dass die darin enthaltenen ovalen und sichelförmigen Sporen pelletierten. Die Sporen wurden dann in 10 ml Protoplastierlösung (20 mg/ml Lysing Enzymes von *T. harzianum* (Sigma, Deisenhofen, Kat.-Nr. L1412), 0,1 % β-Mercaptoethanol in 0,7 M NaCl) resuspendiert und für 3 h bei 30 °C unter mäßigem Schütteln inkubiert. Der Erfolg der Protoplastierung wurde mikroskopisch überprüft.

Die Protoplasten wurden anschließend durch 10-minütige Zentrifugation (800 g, 4 °C) gesammelt, mit 10 ml STC (1 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1 ml STC resuspendiert. Die Protoplasten wurden in 100 µl Aliquots in 15 ml Corning-Röhrchen aufgeteilt und auf Eis gestellt. Die DNA (0,5-10 µg) wurde zugegeben und die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 ml PEG-Lösung (40% (w/v) Polyethylenglykol 4000 (3000-3700 Mr), 0,6 M KCl, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) zugegeben und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jedem Ansatz wurde dann 3-4 ml flüssiges (45 °C) Regenerationsmedium (1 M Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Casein, 0,6 % Agar-Agar) gegeben und auf selektive Platten ausgegossen (Regenerationsmedium mit 1,5 % Agar-Agar und 400 µg/ml Hygromycin B; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Nach 7-10 Tagen wurden die entstehenden Kolonien auf neue selektive Platten (100 µg/ml Hygromycin B) übertragen.

Um sicherzustellen, dass es sich um genetisch einheitliche Isolate handelt, wurden die Kolonien auf Haferflockenagar übertragen, zur Konidienbildung angeregt und die Sporen nochmals in Verdünnung auf selektive Platten (100 µg/ml Hygromycin B) ausplattiert, um monokaryotische Einzelsporisolate zu erhalten.

II.3.7.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation erfolgte nach der TSS-Methode (*Transformation and Storage Solution*) von Chung und Miller (1993). Dazu wurden 25 ml LB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 (exponentielle Wachstumsphase) erreicht hatte, wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 1000 g, 4 °C) gesammelt und in 2,5 ml TSS (20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 10 % PEG 4000 in LB, pH 6,5-6,8, steril filtrieren und 5 % (v/v) DMSO zugeben) aufgenommen. Davon wurden 100 µl Aliquots in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 5-15 min auf Eis inkubiert. An dieser Stelle wurden nicht benötigte Aliquots für eine spätere Verwendung bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurde die DNA (Plasmide, Ligationsansätze, bis maximal 20 µl) zugegeben und weitere 30-60 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 0,9 ml LB zugegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und 10-100 µl auf LB^{amp}-Platten ausplattiert.

Falls die Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion gegeben war, wurde vor dem Ausplattieren der Bakterien 10 µl 100 mM IPTG und 60 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) auf dem Agar verteilt und das Abtrocknen der Flüssigkeit abgewartet.

Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und die Kolonien mittels PCR (s. II.3.4.1) analysiert (bei Blau-Weiß-Selektion nur die weißen oder schwach blauen Kolonien). Dazu wurden die Bakterien mit der Spitze eines Zahnstochers gepickt und direkt in vorbereitete PCR-Ansätze überführt. Die Zellen lysieren während der initialen Denaturierung und die Plasmid-DNA steht als *Template* zur Verfügung.

II.4 Chitin Synthase Gene von *C. graminicola*

II.4.1 Isolierung von Chitin Synthase-Genen

II.4.1.1 *ChsA* und *ChsB*

Beide Gene wurden mit der gleichen Strategie isoliert und werden daher gemeinsam behandelt. Für beide Gene lag bereits ein 619 bp bzw. 638 bp großes Fragment in pTZ19R kloniert vor (A. Schuhmacher, Vertiefungskurs Phytopathologie, Universität Konstanz, 1997). Diese Fragmente wurden durch PCR mit degenerierten Primern (CHS1 u. CHS2) nach Bowen *et al.* (1992) amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Beide Fragmente wurden mit Digoxigenin (DIG) mittels PCR markiert und als Sonde zum Screenen einer genomischen DNA-Bank (Vollmer & Yanofsky, 1986) von *C. graminicola* eingesetzt (siehe II.3.3.3). Die DNA-Bank wurde freundlicherweise von Dr. J. Rollins und Prof. Dr. R. M. Hanau (Purdue University, West Lafayette, IN, U.S.A.) zur Verfügung gestellt. Positive Kolonien wurden isoliert, in LB^{amp} resuspendiert, auf frischen LB^{amp}-Platten ausplattiert und nochmals für eine Kolonie-Hybridisierung eingesetzt. Die positiven Kolonien wurden dann mittels PCR und den Primern CHS1/CHS2 auf das Vorhandensein der *Chs*-Fragmente untersucht. Die Cosmide (pSVchsA bzw. pSVchsB) der abermals positiven Kolonien wurden isoliert und die Sequenz der *Chs*-Gene ermittelt (Sequenzierprimer CHSA1-6 und CHSAr1-r6 bzw. CHSB1-8 und CHSBr1-r7). Die gesamten Gene (d.h. kodierende Sequenz und benachbarte nicht-kodierende Bereiche) wurde dann über eine Expand-PCR (siehe II.3.4.2) aus dem Cosmid amplifiziert (Primer CHSA-Hind/CHSA-Eco bzw. CHSB-Eco/CHSB-Xba). Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hind III/EcoR I (*ChsA*) bzw. EcoR I/Xba I (*ChsB*) verdaut und in entsprechend verdauten pTZ19R kloniert, was zu den Plasmiden pTZchsA und pTZchsB führte.

II.4.1.2 *ChsC* und *ChsD*

Da die von Bowen *et al.* (1992) benutzten Primer nur Homologie zu Chitin Synthasen der Klassen I-III aufweisen, mussten zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von Genen der Klassen IV+V zunächst eigene Primer abgeleitet werden. Dazu wurde mit bekannten

Sequenzen aus der Genbank¹ ein *alignment* erstellt und für zwei stark konservierte Bereiche im Abstand von ca. 680 bp degenerierte Primer synthetisiert (CHS4 und CHS5). Mit deren Hilfe konnten mittels PCR aus genomischer DNA zwei Fragmente von 660 bp bzw. 710 bp amplifiziert werden. Diese wurden mit Klenow-Enzym behandelt und in *Sma*I verdauten pTZ19R ligiert. Die anschließende Sequenzierung und Homologievergleich ergaben, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Fragmente zweier Klasse V Chitin Synthase-Gene handelte (*ChsC* und *ChsD*).

Beide Fragmente wurden dann mittels PCR mit DIG markiert und für das *Screenen* der gen. DNA-Bank eingesetzt. Für *ChsD* (710 bp-Fragment) konnte kein positiver Klon identifiziert werden. Für *ChsC* wurde ein Cosmid (pSVchsC) isoliert, das aber, wie sich bei der Sequenzierung herausstellte, nur einen Teil des Gens (Position +2842 - 4564) enthielt.

Um den restlichen Teil des Gens zu isolieren, wurde eine inverse PCR (s. II.3.4.4) durchgeführt. Im Hind III-Ansatz wurde dabei mit den Primern CHSC3.1 und CHSC5.1 ein 3,93 kb Fragment amplifiziert und mittels des TOPO-TA Cloning Kit in den Vektor pCR4-TOPO kloniert (ergab Plasmid pCR4chsC; Position +834-2905 und +4587 - 6450). Der noch fehlende Teil vom 5'-Bereich des Gens wurde durch eine weitere inverse PCR mit einem Mph1103 I-Verdau und den Primern CHSC6 und CHSC9 isoliert. Da bereits eine Mph1103 I-Schnittstelle im 3'-Bereich bekannt war (Position 5748), sollte das resultierende Produkt fast ausschließlich Sequenzen aus dem 5'-Bereich von *ChsC* enthalten. Tatsächlich konnte ein 4,3 kb Fragment amplifiziert und mittels TOPO-TA Cloning kloniert werden (Plasmid pchsC-5'). Dieses Fragment enthielt den restlichen kodierenden Bereich von *ChsC* sowie einen großen Teil des Promotorbereichs (Position -2402 - +1836). Die Sequenzierung von *ChsC* erfolgte an beiden Strängen mit den Primern CHSC1-15 und CHSCr1-r11.

Alle Versuche, weitere Teile von *ChsD* über inverse PCR oder direkte Sequenzierung genomischer DNA zu erhalten, blieben erfolglos.

II.4.2 Inaktivierung von Chitin Synthase-Genen

Um Geninaktivierungen (*knock-outs*) durchzuführen, wurde ein Teil der entsprechenden Gene durch die Hygromycin B-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUCATPH (Lu *et al.*, 1994) ersetzt, die das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle

¹ *N. crassa* *Chs4*, Acc-No. U25097; *M. grisea* *Chs4*, AF020528; *A. nidulans* *ChsE*, U52362; *C. albicans* *Chs3*, D13454; *S. cerevisiae* *Chs3*, X57300; *U. maydis* *Chs5*, AF030553; *U. maydis* *Chs6*, AF030554; *A. nidulans* *ChsD*, U62895; *A. fumigatus* *ChsE*, S78102

des TrpC-Promotors von *A. nidulans* enthält. Nach Transformation in *C. graminicola* wird dann in einigen Fällen das Wildtyp-Gen durch Doppel-*crossover* mit den homologen Bereichen auf beiden Seiten der Resistenzkassette durch die mutierte Form ersetzt.

II.4.2.1 *ChsA*

Zur Inaktivierung von *ChsA* wurde folgender Vektor konstruiert: Das Plasmid pTZchsA (s. II.4.1.1) wurde mit Cfr42 I und BamH I verdaut, wodurch ein 1037 bp großes Stück aus der kodierenden Region von *ChsA* entfernt wurde. Die Enden wurden mit Klenow-Enzym geglättet. Das Plasmid pUCATPH wurde mit Sal I verdaut, ebenfalls mit Klenow-Enzym behandelt und das 2395 bp-Fragment, das die Hygromycin-Resistenz Kassette enthält, mit dem verdauten pTZchsA ligiert, was zum Plasmid pTZ Δ chsA führte.

Für die Transformation von *C. graminicola* wurde mittels Expand-PCR und den Primern CHSAr1 und CHSAr4 ein 4,37 kb großer Bereich aus pTZ Δ chsA amplifiziert, welcher auf beiden Seiten der Resistenzkassette 1000 bp bzw. 971 bp von *ChsA* umfasst (Abb. 2.1).

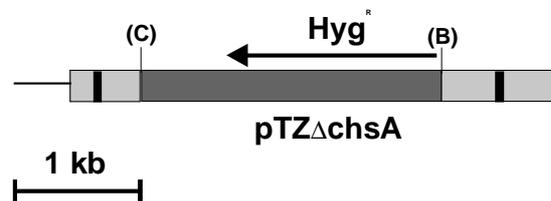


Abb. 2.1: Darstellung des PCR-Produkts von pTZ Δ chsA, welches für die Transformation von *C. graminicola* genutzt wurde. Hellgrau dargestellt ist der kodierende Bereich des Gens, dunkelgrau die Hygromycin-Resistenzkassette. Die schwarzen Balken geben Größe und Lage der Introns an. C und B geben die Schnittstellen für Cfr42 I bzw. BamH I an. Klammern bedeuten, dass die ursprünglich dort vorhandene Schnittstelle durch die Ligation zerstört wurde.

II.4.2.2 *ChsB*

Um *ChsB* zu inaktivieren, wurde zunächst das Plasmid pTZchsB (siehe II.4.1.1) mit Acc65 I und Nde I verdaut, und so 1093 bp von der kodierenden Sequenz entfernt. Plasmid pUCATPH wurde ebenfalls mit Acc65 I komplett und anschließend mit Nde I partiell verdaut und das 2691 bp Stück mit der Hygromycin-Resistenzkassette durch Elution aus dem Agarosegel isoliert. Die Ligation mit dem zuvor verdauten und dephosphorylierten pTZchsB

resultierte in Plasmid pTZ Δ chsB. Mit den Primern CHSBr1 und CHSBr7 wurde dann in einer Expand-PCR ein 4,91 kb-Fragment amplifiziert (Abb. 2.2) und für die Transformation von *C. graminicola* eingesetzt. Die noch erhaltenen *ChsB*-Sequenzen auf beiden Seiten der Resistenzkassette betragen 1336 bp bzw. 886 bp.

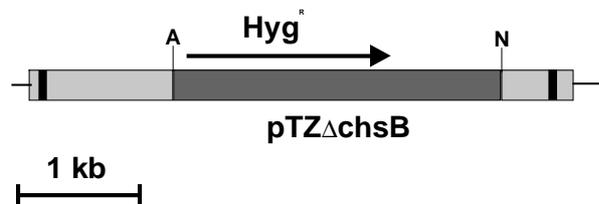


Abb. 2.2: Darstellung des PCR-Produkts von pTZ Δ chsB, welches für die Transformation von *C. graminicola* genutzt wurde. Hellgrau dargestellt ist der kodierende Bereich des Gens, dunkelgrau die Hygromycin-Resistenzkassette. Die schwarzen Balken geben Größe und Lage der Introns an. A und N geben die Schnittstellen für Acc65 I bzw. Nde I an.

II.4.2.3 *ChsC*

Für die Konstruktion des *ChsC* Inaktivierungs-Vektors wurde das Plasmid pCR4chsC genutzt. Dieses entstand durch die Klonierung eines Produktes aus inverser PCR (siehe II.4.1.2). Das Insert besteht aus den Nukleotiden 4587 – 6450 und 834 – 2905 des *ChsC*-Gens, die über die religierten Hind III-Schnittstellen bei 6450 und 834 miteinander verknüpft sind. Somit sind bereits 5'- und 3'-liegende Bereiche des Gens, unterbrochen durch die Sequenz des pCR4-TOPO-Vektors vorhanden. Dieses Plasmid wurde mit Sal I (schneidet bei Position 1808 und 4829) verdaut, so dass ein Fragment mit 974 bp vom 5'-Bereich bzw. 1621 bp vom 3'-Bereich des Gens übrig blieb. Das Plasmid pUCATPH wurde mit Hind III linearisiert (5081 bp). Beide DNA-Stücke wurden mit T4-Polymerase soweit aufgefüllt, dass noch ein T- (*ChsC*) bzw. A-Überhang (pUCATPH) übrig blieb. Beides wurde anschließend ligiert, in *E. coli* transformiert und das fertige Plasmid (pUC Δ chsC) isoliert. Dieses Plasmid wurde dann noch an der Hind III-Stelle, die das 5'- und das 3'-Ende verbindet, aufgeschnitten und für die Transformation von *C. graminicola* eingesetzt (Abb. 2.3).

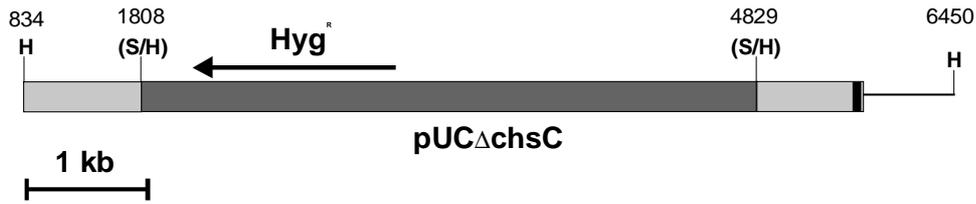


Abb. 2.3: Darstellung des linearisierten Vektors pUC Δ chsC, welcher für die Transformation von *C. graminicola* genutzt wurde. Hellgrau dargestellt ist der kodierende Bereich des Gens, dunkelgrau die Hygromycin-Resistenzkassette. Der schwarze Balken gibt Größe und Lage des Introns an. H und S geben die Schnittstellen für Hind III bzw. Sal I an. Klammern bedeuten, dass die ursprünglich dort vorhandenen Schnittstellen durch die Ligation zerstört wurden. Die Zahlen geben die Position der Schnittstellen in der *ChsC*-Sequenz an.

II.4.3 Expression des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) unter der Kontrolle von *Chs*-Promotoren

Das verwendete GFP-Gen stammte aus dem Vektor gGFP, welcher freundlicherweise von Dr. A. Sharon (Universität Tel Aviv, Israel) zur Verfügung gestellt wurde (Maor *et al.*, 1998). Das GFP wurde aus diesem Vektor mit Nco I und EcoR I ausgeschnitten, die Nco I-Schnittstelle mit T4-Polymerase geglättet und das Fragment in Sma I/EcoR I-verdautes pTZ19R ligiert und so das Plasmid pTZGFP erstellt. Durch die Ligation entstand eine neue Nco I-Schnittstelle (CCATGG), welche das ATG-Startcodon des GFP-Gens enthält.

II.4.3.1 *ChsA*

Zur Amplifikation des Promotors wurde zunächst eine PCR mit den Primern A-GFP1 (enthält eine Xba I-Schnittstelle) und A-GFP2 (liegt 3'-wärts einer Nco I-Schnittstelle) und dem Plasmid pSVCHSA5 (siehe II.4.1.1) als *Template* durchgeführt. Das Produkt wurde mit Xba I und Nco I verdaut und in ebenso verdautes pTZGFP ligiert, was zum Plasmid pAGFP führte. Dieses enthält 926 bp aus dem 5'-nichttranslatierten Bereich von *ChsA* (den Promotor) und 157 bp kodierende Sequenz, an welche sich dann das GFP-Gen anschließt.

II.4.3.2 *ChsB*

Die Vorgehensweis für *ChsB* war analog zu *ChsA*. Die Primer B-GFP1 und B-GFP2 enthielten eine Xba I bzw. eine Nco I-Schnittstelle. Als *Template* wurde pSVCHSB9 (siehe II.4.1.1) eingesetzt. Nach der Ligation in pTZGFP entstand das Plasmid pBGFP, welches 663 bp Promotor-Sequenz und 43 bp codierende Sequenz vor dem GFP-Gen enthält.

II.4.3.3 *ChsC*

Für das *ChsC*-Konstrukt wurde eine PCR mit den Primern CHSC6 und CHSC13 und dem Plasmid pCHSC-5' (siehe II.4.1.2) durchgeführt und das Produkt anschließend mit XmaJ I und Nco I verdaut. XmaJ I erzeugt zu Xba I kompatible Enden, so dass das Produkt wie die beiden anderen in Xba I/Nco I-verdautes pTZGFP ligiert werden konnte. Das daraus resultierende Plasmid pCGFP enthält 2121 bp Promotor sowie 229 bp kodierende Sequenz von *ChsC*.

Alle oben genannten Plasmide wurden mittels Cotransformation zusammen mit dem Hygromycin-Resistenz vermittelnden Plasmid pUCATPH in *C. graminicola* transformiert (siehe II.3.7.1).

II.5 weitere Methoden

II.5.1 Versuche mit dem Chitin Synthase Inhibitor Nikkomycin Z

Nikkomycin Z (Sigma, Deisenhofen) wurde der Sporensuspension, welche für die Inokulation von Blättern bzw. zur Erzeugung von *in vitro*-Strukturen eingesetzt wurde (siehe Abschnitt II.1) in Konzentrationen von 10-500 µM zugegeben. Für die Auswertung der *in vitro* Versuche wurden für jede Konzentration in 3 unabhängigen Experimenten je 100 Strukturen ausgezählt.

II.5.2 Bestimmung des Chitin-Gehalts

II.5.2.1 Chemische Bestimmung

Für die Analyse der Zellwandzusammensetzung wurden die Zellwände der verschiedenen Isolate nach folgendem Protokoll isoliert: ca. 1-1,5 g Mycel wurde mit eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Anschließend wurde nochmals zweimal mit ca. 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und dreimal mit ca. 20 ml Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) entfettet (bzw. so oft, bis die Extrakte farblos waren). Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellwände über eine Zentrifugation für 10 min bei 5000 g und 4 °C im *Swing-out* Rotor (HB-6) pelletiert. Dann wurde einmal mit Aceton nachgewaschen und das Material in der Speed-vac getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Zellwände mit flüssigem N_2 homogenisiert. Das so erhaltene Material wurde dann freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Bruno Moerschbacher an der Universität Münster, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, mittels Gaschromatographie analysiert und so die Mengen der einzelnen Zuckermonomere bestimmt.

II.5.2.2 Calcofluor-Färbung

Hyphen von *C. graminicola* wurden für 10-15 min in 0,03 % Calcofluor White gefärbt, zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop (Filter UV-2A) betrachtet.

II.5.3 Mikroskopie

II.5.3.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden an einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop durchgeführt. Dieses war – neben der normalen Hellfeldoptik - sowohl mit Differentiellem Interferenz Kontrast (DIC) als auch für Fluoreszenzmikroskopie ausgerüstet. Dabei kamen folgende Filter zum Einsatz:

UV-2A: Ex 330-380 nm, DM 400 nm, BA 420 nm

GFP: Ex 440-480 nm, DM 505 nm, BA 535-550 nm

Die Dokumentation erfolgte über ein angeschlossene Digitalkamera und die von Nikon bereitgestellte Lucia G-Software.

III Ergebnisse

III.1 Ergebnisse der Inhibitionsversuche

Um die Bedeutung von Chitin für die Stabilität der Zellwand zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung zu untersuchen, wurden Versuche mit dem Chitin Synthase Inhibitor Nikkomycin Z durchgeführt. Dabei wurden einerseits die Bildung von Infektionsstrukturen und vegetativen Hyphen *in vitro* unter Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen des Hemmstoffs untersucht, andererseits die Fähigkeit zur Penetration und damit zur Infektion der Wirtspflanze auf Maisblattstücken getestet.

III.1.1 *in vitro* Tests

Bei diesen Tests wurden pro Konzentration je 3mal 100 Infektionsstrukturen im Mikroskop ausgezählt und bewertet (Abb. 3.1).

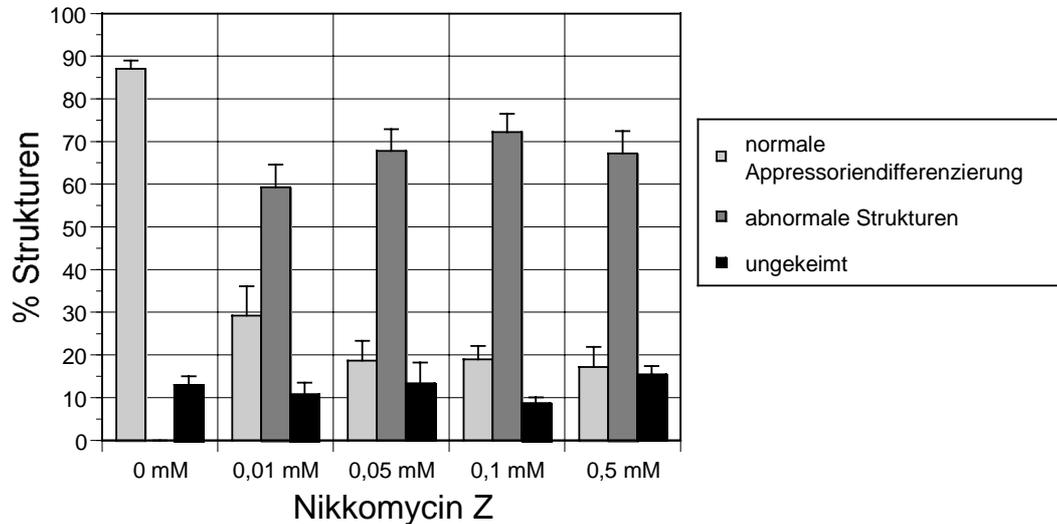


Abb. 3.1: Einfluss von Nikkomycin Z auf Infektionsstrukturen von *C. graminicola*: Die Anzahl normaler Strukturen (hellgrau) nimmt mit zunehmender Konzentration ab, wofür im Gegenzug der Anteil abnormaler Strukturen (dunkelgrau) ansteigt. Die Zahl der ungekeimten Sporen (schwarz) bleibt unverändert.

Man sieht, dass ohne Inhibitor nahezu 90 % der Sporen ausgekeimt sind und ein Appressorium gebildet haben, das meist unmittelbar an der Spore ansetzt und in der Regel eine leicht gelappte Form aufweist (Abb. 3.2 A). Im Gegensatz dazu weisen bereits bei 10 μ M

Nikkomycin Z über die Hälfte der Strukturen abnorme Merkmale auf. Dazu gehören vergrößerte, vollständig runde Appressorien (Abb. 3.2 B u. D), die Ausbildung von blasig aufgetriebenen Keimschläuchen (Abb. 3.2 C u. D) und – vor allem bei den höheren Konzentrationen- die Ausbildung von großen Blasen anstelle des Keimschlauchs bzw. des Appressoriums, die dann nur noch schwach oder gar nicht melanisiert sind (Abb. 3.2 E). Diese großen Blasen sind bisweilen kollabiert, was auf einem Aufplatzen dieser Strukturen beruhen könnte (Abb. 3.2 F).

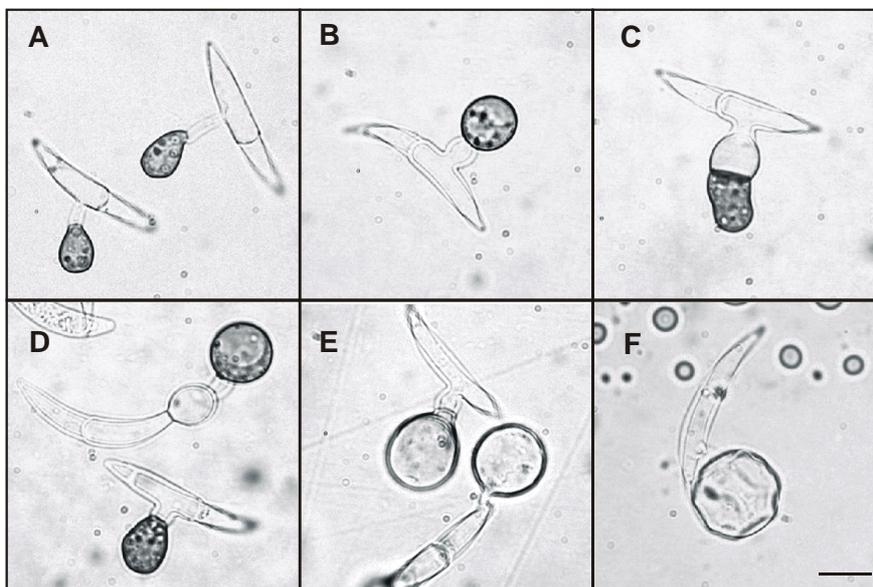


Abb. 3.2: Infektionsstrukturen von *C. graminicola* nach Behandlung mit Nikkomycin Z. A zeigt die Kontrolle, also das normale Aussehen, B-F zeigen verschiedene unter Einfluss des Inhibitors auftretende morphologische Defekte. Der Balken repräsentiert 10 μm .

Die Zahl dieser abnormen Strukturen steigt bei höheren Inhibitorkonzentrationen an und erreicht bei 100 μM ein Maximum von $72,2 \pm 4,3$ %. Die Zahl der ungekeimten Sporen ist nahezu konstant, was zeigt, dass der Inhibitor im verwendeten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die Keimrate hat (Abb. 3.1).

Auch das Wachstum vegetativer Hyphen ist durch Nikkomycin Z stark beeinträchtigt (Abb. 3.3). Auf der gesamten Länge der Hyphen bilden sich blasige Ausstülpungen, die Wachstumsgeschwindigkeit ist allerdings nicht signifikant reduziert (ohne Abb.).



Abb. 3.3: Vegetative Hyphen von *C. graminicola* in Flüssigmedium, aufgenommen im differentiellen Interferenzkontrast: A zeigt die Kontrolle, B und C zeigen Hyphen unter dem Einfluss von Nikkomycin Z (100 µM). Der Balken entspricht 20 µm.

III.1.2 Infektionstest

Für den Infektionstest wurde der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen der Sporenlösung zugesetzt und von dieser dann Tropfen auf abgeschnittene Blätter gesetzt. Nach 5 Tagen wurden die Blätter auf Symptome untersucht (Abb. 3.4). Es zeigte sich, dass bei 10 µM Nikkomycin Z noch ebenso starke Nekrosen wie auf dem Kontrollblatt ohne Inhibitor auftraten. Bei 50 µM war die Symptomausprägung schon stark reduziert, um bei 100 und 500 µM dann vollständig zu unterbleiben.

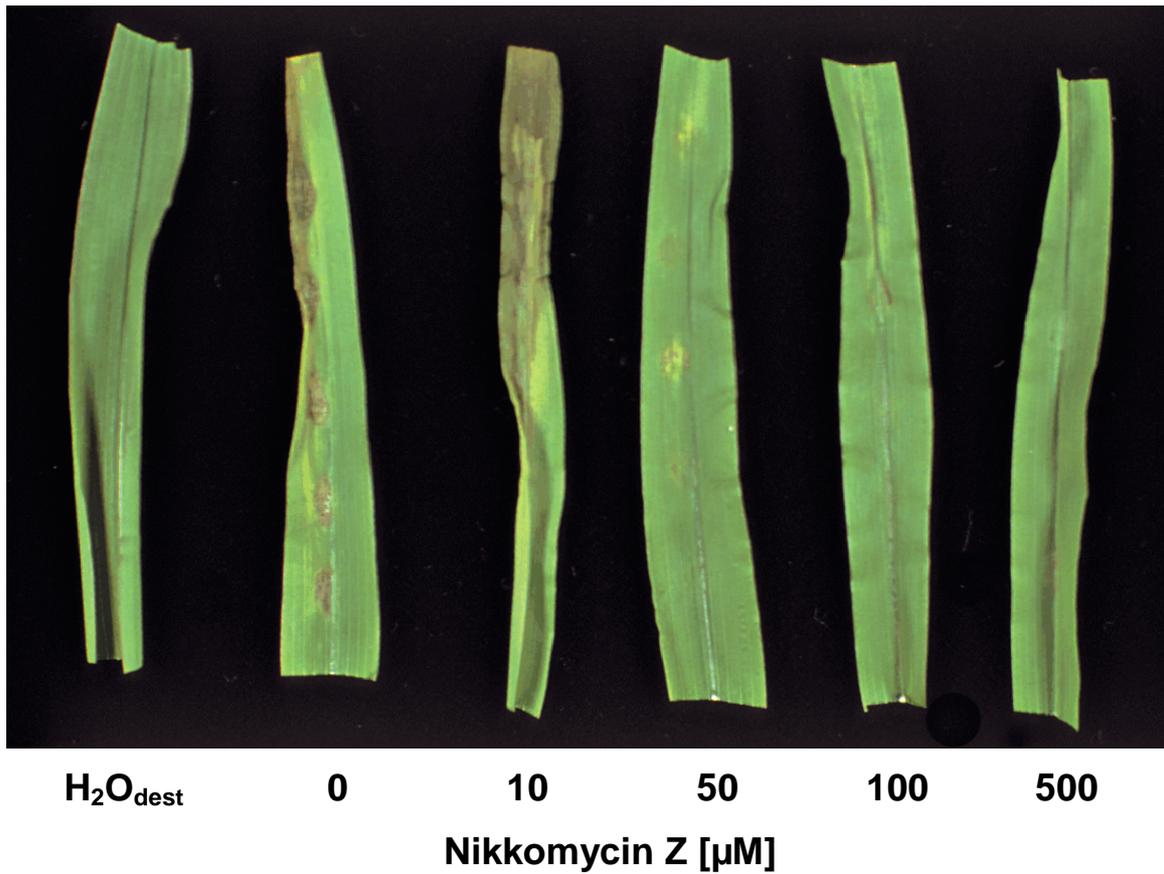


Abb. 3.4: Maisblätter 5 Tage nach Inokulation mit einer Sporensuspension von *C. graminicola* mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nikkomycin Z. Unbehandelte Sporen infizieren gut und führen zur Ausbildung von Nekrosen. Die Symptombildung geht mit steigender Inhibitorkonzentration zurück.

III.2 Chitin Synthasen aus *C. graminicola*

Die Sequenzen der Gene *ChsA*, *ChsB* und *ChsC* und des Fragments von *ChsD* sowie die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen finden sich im Anhang dieser Arbeit (VII.4). Die Gensequenzen wurden außerdem in der Genbank unter den Zugangsnummern AY052545 (*ChsA*), AY052546 (*ChsB*) und AY052547 (*ChsC*) abgelegt.

III.2.1 Auswertung der Sequenzen

III.2.1.1 *ChsA*

ChsA besitzt ein von zwei Introns unterbrochenes offenes Leseraster (*open reading frame*, ORF) von 2805 bp (inkl. Introns). Die Introns liegen an Position 216–273 bzw. 2040–2087 (Start-Codon ATG = Pos. 1 – 3) und besitzen die für pilzliche Introns typischen Consensus-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende sowie an der internen Bindestelle zur Ausbildung der „Lasso-Struktur“, wie sie beim Spleißen auftritt (Hahn *et al.*, 1997). Durch Sequenzierung von RT-PCR-Produkten, die den gesamten codierenden Bereich abdeckten, wurde die Zahl, Position und genaue Größe der Introns bestätigt. Das Startcodon ATG wurde einerseits durch Vergleich mit homologen Sequenzen bestimmt, zum anderen finden sich 5'-wärts Stopcodons in allen drei Leserastern. Außerdem finden sich einige für eukaryotische Promotoren typische CAAT-Boxen. Der Transkriptionsstart und die Polyadenylierungsstelle konnten auch mit Hilfe von Computerprogrammen nicht mit absoluter Sicherheit bestimmt werden.

Mittels *in silico* Analysen² wurden im Promotorbereich noch einige potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt (Quandt *et al.*, 1995). Innerhalb von 950 bp 5'-wärts des Startcodons fanden sich am häufigsten Bindestellen für die Faktoren Nit2 (7 Übereinstimmungen), StuA (6 Übereinstimmungen) sowie mehrere *stress response elements* (STRE, 6 Übereinstimmungen). Bei den StuA-Bindestellen ist aber zu beachten, dass aufgrund der symmetrischen Konsensussequenz an derselben Position meist zwei Bindestellen angezeigt werden (Tab. 3.1).

Nit2 ist ein Transkriptionsfaktor aus *N. crassa* mit einer Zink-Finger DNA-Bindedomäne (Fu & Marzluf, 1990). Nit2 ist der Hauptfaktor für die positive Regulation von Genen, die am Stickstoffkreislauf beteiligt sind, d.h. er reguliert die Expression abhängig vom Vorhandensein verschiedener externer Stickstoffquellen. Eine Beteiligung bei der Regulation der Chitin Synthese wurde bislang nicht untersucht.

Der Transkriptionsfaktor StuA ist aus *A. nidulans* bekannt (Dutton *et al.*, 1997). Die APSES-Domäne ist für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung verantwortlich und besitzt eine *helix-loop-helix*-artige Struktur. StuA spielt in *A. nidulans* eine Rolle bei der Differenzierung von Hyphen zu sexuellen und asexuellen Fortpflanzungsorganen.

STREs kommen in zahlreichen Genen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* vor und spielen eine Rolle bei der Reaktion auf zahlreiche äußere Umwelteinflüsse wie Hitzeschock, Stickstofflimitierung, oxidativer und osmotischer Stress usw. (Schuller *et al.*, 1994). Da bei

² MatInspector V2.2 beruhend auf der Datenbank Transfac 4.0 im Internet unter <http://transfac.gbf.de>

diesen Prozessen häufig auch die Zellwand betroffen ist, erscheint es plausibel, dass auch die Chitin Synthese über solche Elemente reguliert wird.

Element	Konsensus	Position in den <i>Chs</i> -Genen	Referenz
Nit2	TATCtm	<i>ChsA</i> : -825, -814, -654, -650, -464, -345, -84 <i>ChsB</i> : -488 <i>ChsC</i> : -885, -643, -467, -220, -44	(Fu & Marzluf, 1990)
StuA	nwwCGCGwnn	<i>ChsA</i> : -811, -612, -495 <i>ChsB</i> : -195, -86 <i>ChsC</i> : -545, -51	(Dutton <i>et al.</i> , 1997)
STRE	tnAGGGGn	<i>ChsA</i> : -907, -804, -787, -408, -309, -128 <i>ChsB</i> : -725, -329, -279 <i>ChsC</i> : -823, -793, -751, -647, -526, -308	(Schuller <i>et al.</i> , 1994)
Gcr1	rgCTTCcwc	<i>ChsA</i> : -99 <i>ChsB</i> : -803, -775, -480, -407, -313, -177 <i>ChsC</i> : -200	(Huie <i>et al.</i> , 1992)
AbaA	yynCATTCy	<i>ChsA</i> : -859, -48 <i>ChsC</i> : -1006, -966, -729, -330	(Andrianopoulos & Timberlake, 1994)
Mat a1	tGATGtannt	<i>ChsA</i> : -439 <i>ChsB</i> : -42 <i>ChsC</i> : -233, -38	(Goutte & Johnson, 1994)
Mat1-Mc	yynaTTGTy	<i>ChsC</i> : -532	(Kjaerulff <i>et al.</i> , 1997)

Tab. 3.1: Vorkommen von Promotorelementen in den *Chs*-Genen von *C. graminicola*. Bei *ChsC* wurden nur die letzten 1000 bp vor dem Translationsstart berücksichtigt. Die Konsensussequenz besteht aus einem stark konservierten Kernbereich (Großbuchstaben) und einer weniger stark konservierten Umgebung (Kleinbuchstaben). Dabei bedeutet: N = A, C, G, T; W = A, T; Y = C, T; R = A, G und M = A, C

Das aus der DNA-Sequenz abgeleitete Protein ist 899 Aminosäuren (aa) lang und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 101,4 kDa. Das erste Drittel des Proteins ist hydrophil, das mittlere neutral und im hinteren Drittel befinden sich mehrere mögliche membranspannende Domänen, wie sie auch von anderen Chitin-Synthasen bekannt sind. Die höchste Homologie (auf Proteinebene) findet sich zu *N. crassa* Chs3 (Genbank Acc. No. AAF00101), mit 74 % Identität über den gesamten Bereich. ChsA zählt damit zur Klasse I der Chitin Synthasen (Abb. 3.5).

Neben der codierenden Sequenz wurden noch weitere 950 bp im 5'- bzw. 283 bp im 3'-Bereich sequenziert.

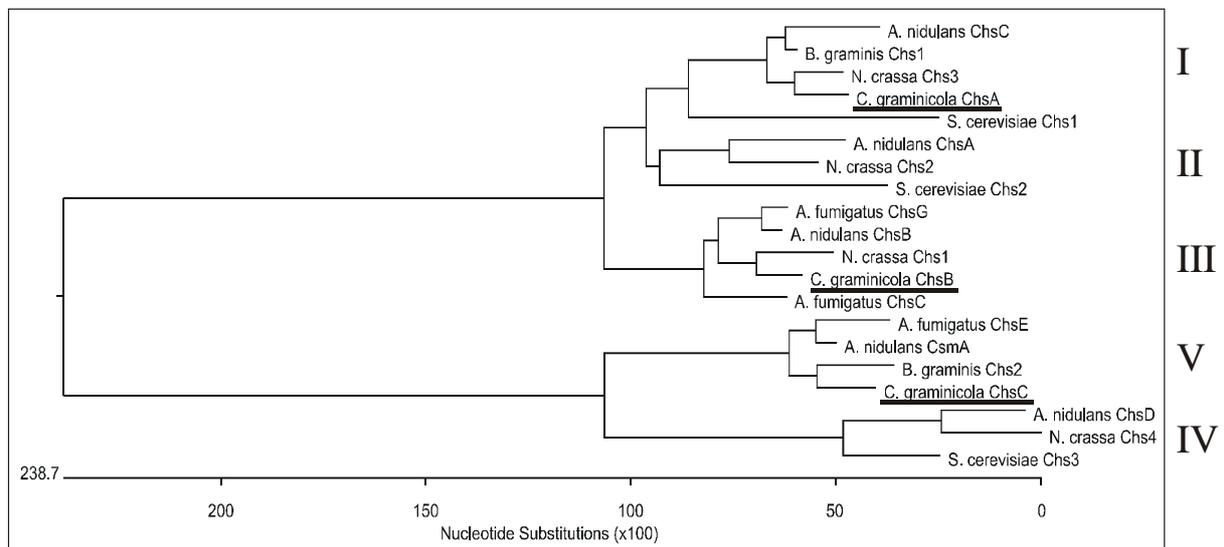


Abb. 3.5: Stammbaum von Chitin Synthasen mit der Einordnung von ChsA, ChsB und ChsC von *C. graminicola*. ChsA gehört zu Klasse I, ChsB zu Klasse III und ChsC zu Klasse V. Für das *alignment* wurden nur vollständige Sequenzen aus der Genbank benutzt³.

³ Die Genbank Zugangsnummern lauten: *A. fumigatus* ChsC: X94245; *A. fumigatus* ChsG: X94244; *A. fumigatus* ChsE: U62614; *A. nidulans* ChsA: D21268; *A. nidulans* ChsB: D21269; *A. nidulans* ChsC: D38409; *A. nidulans* ChsD: D83246; *A. nidulans* CsmA: BAA21714; *B. graminis* Chs1: AF188934; *B. graminis* Chs2: AAF04279; *N. crassa* Chs1: M73437; *N. crassa* Chs2: X77782; *N. crassa* Chs3: AAF00101; *N. crassa* Chs4: U25097; *S. cerevisiae* Chs1: M14045; *S. cerevisiae* Chs2: M23865; *S. cerevisiae* Chs3: X57300

III.2.1.2 *ChsB*

ChsB weist eine sehr ähnliche Struktur auf wie *ChsA*. Das ORF erstreckt sich über 2861 bp mit ebenfalls 2 Introns (Position 75–141 und 2668–2723), die auch durch Sequenzierung der RT-PCR-Produkte verifiziert wurden. Die bekannte Sequenz erstreckt sich über weitere 813 bp im 5'-Bereich und 557 bp im 3'-Bereich des codierenden Abschnitts.

Der Promotorbereich wurde wie bei *ChsA* mit Hilfe von Computerprogrammen analysiert. Dabei fanden sich Bindestellen für die bereits oben erwähnten Elemente STRE (3 Übereinstimmungen) und StuA (4 Übereinstimmungen) sowie sechs Bindestellen für den Faktor Gcr1, der in *S. cerevisiae* notwendig für eine hohe Expression von Genen der Glykolyse ist (Huie *et al.*, 1992) (Tab. 3.1).

Die Translation des codierenden Bereichs führt zu einem Protein aus 912 aa mit einem errechneten Molekulargewicht von 102,1 kDa. Der Aufbau ist entsprechend *ChsA* mit mehreren Transmembrandomänen im C-terminalen Bereich. Die höchste Homologie besteht zu *N. crassa* Chs1 (Acc. No. M73437) mit 71 % Identität, somit zählt *ChsB* zur Klasse III der Chitin Synthasen (Abb. 3.5).

III.2.1.3 *ChsC*

Die Sequenz von *ChsC* enthält ein ORF von 5709 bp mit ebenfalls 2 Introns (Position 311-367 und 5624-5677). Das entspricht einem Protein von 1866 aa mit einem Molekulargewicht von 207,2 kDa. Zusätzlich dazu sind 2401 bp 5'-wärts und 740 bp 3'-wärts bekannt. Die *in silico* Analyse des Promotorbereichs ergibt Unterschiede je nach Größe des untersuchten Abschnitts.

In den 1000 bp vor dem Startcodon finden sich sechs STRE-Elemente, fünf Nit2-Elemente sowie je vier Bindestellen für StuA und AbaA (Tab. 3.1). Das Gen *AbaA* findet sich in *A. nidulans* und codiert für ein Protein mit einem ATTS DNA-Bindemotiv (Andrianopoulos & Timberlake, 1994). Dieser Faktor ist notwendig für die letzten Stadien der Konidiophorenentwicklung. Bezieht man noch die weiteren bekannten ca. 1400 bp in die Analyse mit ein, findet man je zwei weitere STRE- und AbaA-Elemente, je acht weitere StuA- und Nit2-Bindestellen, sowie insgesamt neun Mat a1- und drei Mat1-Mc-Bindestellen. Bei Mat a1 handelt es sich um responsive Elemente für den *mating* Faktor a1 von *S. cerevisiae*, der als Heterodimer mit dem Faktor $\alpha 2$ an die DNA bindet (Goutte & Johnson, 1994). Mat1-Mc ist ein HMG-Box Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*, das unter

Stickstoffmangelbedingungen exprimiert wird und zur Differenzierung von Zellen des Minus-Paarungstyps führt (Kjaerulff *et al.*, 1997).

Die größte Homologie auf Proteinebene besteht zu *M. grisea* Csm1 (Acc. No. BAA74449) mit 72 % Identität. ChsC ist damit eine Klasse V Chitin Synthase mit einer Myosin-artigen Domäne (Abb. 3.5). Diese Domäne erstreckt sich über fast die Hälfte des Proteins (ca. 700 aa des N-Terminus) und enthält die typische ATP-Binde-Domäne, den sog. „*P-Loop*“ („GESGSGK“; Aminosre. 105-111). Der Rest des Proteins weist die für Chitin Synthasen kennzeichnenden Merkmale auf, also die Dreiteilung in einen hydrophilen, einen neutralen und einen Transmembranbereich am C-Terminus.

Allen drei komplett sequenzierten Genen gemeinsam ist ein GC-Gehalt des codierenden Abschnitts von 55-56 % und die Tatsache, dass bei allen zwei kurze Introns vorkommen, wovon das eine nahe am Beginn, das andere nahe am Ende der codierenden Region liegt. Dies ist besonders deutlich bei *ChsC*, wo das zweite Intron nur 32 bp vor dem Stop-Codon liegt.

III.2.1.4 *ChsD*

Die für *ChsD* vorhandene Sequenzinformation beschränkt sich auf 703 bp und die Tatsache, dass dieses Gen sehr wahrscheinlich wie *ChsC* für eine Klasse V Chitin Synthase codiert und innerhalb dieser Sequenz ein Intron besitzt.

III.2.2 Untersuchungen zur Expression

III.2.2.1 RT-PCR

Die Expression der Chitin Synthase Gene wurde mittels RT-PCR und genspezifischen Primern untersucht. Dazu wurden gleiche Mengen Gesamt-RNA von vegetativen Hyphen, von bis zu Appressorien differenzierten Infektionsstrukturen, sowie von gesunden und infizierten Pflanzen eingesetzt. Um Verunreinigungen durch DNA auszuschließen, wurde erstens ein DNase-Verdau durchgeführt und zweitens die Primer so gewählt, dass bei DNA als *Template* ein Intron mitamplifiziert würde, sich also die RT-PCR Produkte von RNA von den PCR Produkten der DNA unterscheiden.

Als Ergebnis lässt sich feststellen, dass alle vier Gene in allen untersuchten Stadien (außer natürlich in gesunden Pflanzen) gleichermaßen exprimiert werden (Abb. 3.6). Allerdings ist diese Methode nicht geeignet, kleine Unterschiede in der Expressionsintensität darzustellen.

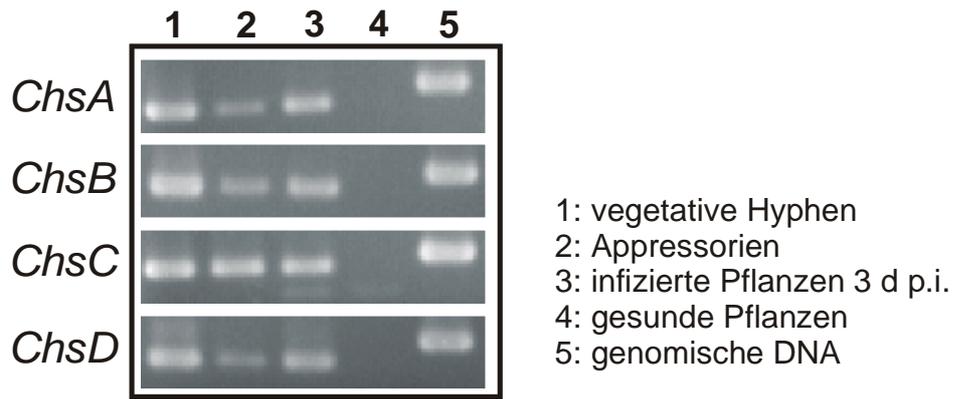


Abb. 3.6: RT-PCR von allen vier Chitin Synthase Genen aus *C. graminicola* mit Gesamt-RNA aus vegetativen Hyphen (1), Infektionsstrukturen, die bis zum Appressorium entwickelt waren (2), infizierten (3) und gesunden Pflanzen (4). Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit genomischer DNA (5) durchgeführt. Folgende Primerpaare wurden eingesetzt (siehe Anhang): *ChsA*: CHSA4, RTA2.2 (458 bzw. 506 bp (RNA/DNA)); *ChsB*: CHSBr1, CHSB3 (380/446 bp); *ChsC*: CHSCko, CHSC13 (465/520 bp); *ChsD*: RTD1, RTD2 (461/516 bp)

III.2.2.2 Promotor-GFP-Fusionen

Für alle drei vollständigen Gene wurden Konstrukte hergestellt, die Promotoren mit dem GFP-Reportergen verknüpfen (siehe Methodenteil). Diese Konstrukte wurden mittels Cotransformation in *C. graminicola* eingebracht. Als Kontrolle diente das Plasmid gGFP, das neben einer Hygromycin-Resistenz das GFP-Gen unter der Kontrolle des GAPDH-Promotors von *A. nidulans* besitzt (Maor *et al.*, 1998). Für das *ChsA*- und das *ChsB*-Konstrukt, aber nicht für *ChsC*, konnten Hygromycin-resistente Isolate gefunden werden, die zusätzlich noch grüne Fluoreszenz aufwiesen. Abb. 3.7 zeigt den Nachweis der Integration der Konstrukte in ein gGFP-, zwei A-GFP- und zwei B-GFP- Isolate (von insgesamt sechs, zwei bzw. zwölf unabhängigen Transformanden) mittels PCR. Dabei kamen Primer zum Einsatz, die sowohl im Promotor, als auch im GFP-Gen binden und somit spezifisch für die eingesetzten Konstrukte sind. Diese Isolate wurden im Folgenden fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

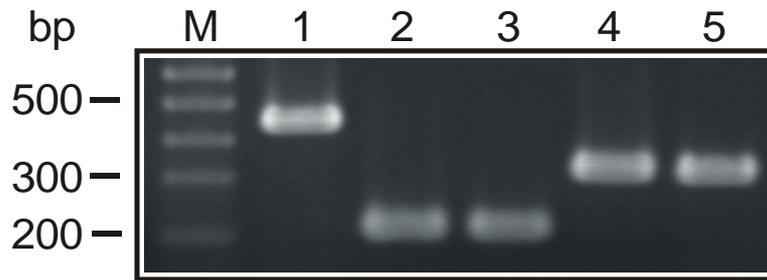


Abb. 3.7: Nachweis der GFP-Konstrukte in fluoreszierenden *C. graminicola* Isolaten mittels PCR. M = Größenstandard; 1: CgGFP4 mit Primern *gpd* und GFP5' (440 bp); 2+3: CgAGFP1 und 2 mit Primern CHSAr2 und GFP5' (207 bp); 4+5: CgBGFP1 und 2 mit Primern CHSBr1 und GFP5' (320 bp)

Als Ergebnis der Untersuchungen lässt sich feststellen, dass es keine bedeutenden Unterschiede im Expressionsmuster der Vektoren gibt. Sowohl in vegetativen Hyphen, als auch in Sporen, Appressorien und Infektionshyphen ist Fluoreszenz zu sehen (Abb. 3.8). Diese ist in den A-GFP-Isolaten am schwächsten und dort wiederum in den sekundären Infektionshyphen. Die stärkste Fluoreszenz ist in allen Fällen in den sporogenen Hyphen und den Sporen zu beobachten, wohingegen die Setae (dunkel gefärbte, sterile Hyphen innerhalb der Acervuli) keine Fluoreszenz zeigen. Dies könnte aber auch an der Pigmentierung der Zellwände liegen, die eventuell die Fluoreszenz überdeckt. Interessanterweise findet man bei gekeimten Sporen häufig die Fluoreszenz nur noch in der Hälfte der Spore, die ausgekeimt ist. Auch die meisten Appressorien erscheinen nach einiger Zeit dunkel, was einerseits an der Melanisierung, andererseits auch an einer Verlagerung des Cytoplasmas in die Infektionsvesikel und primären Hyphen nach erfolgter Penetration liegt. Insgesamt lässt sich sagen, dass alle untersuchten Promotoren zu einer konstitutiven GFP-Expression führen, was gut mit den Daten aus der RT-PCR übereinstimmt.

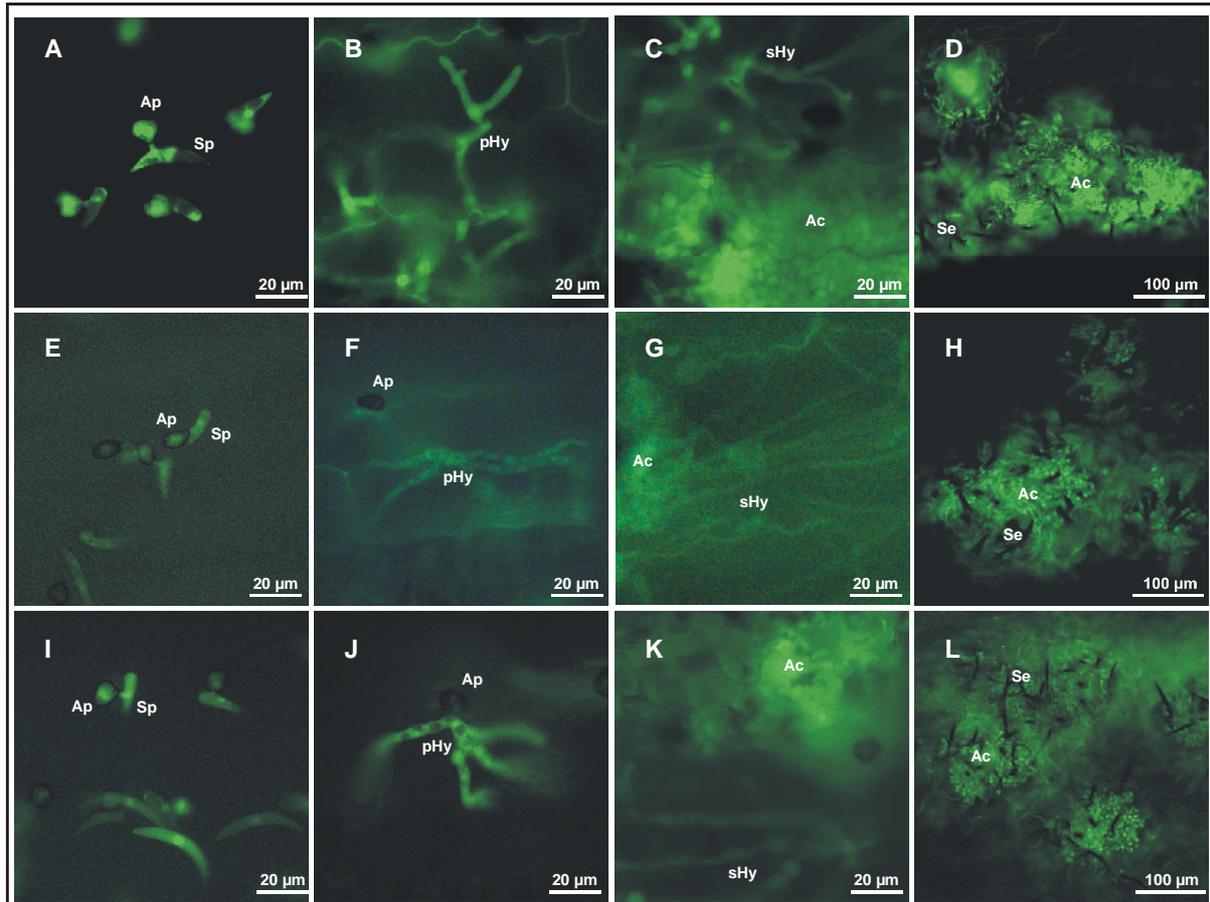


Abb. 3.8: Fluoreszenzaufnahmen des Infektionsverlaufs von gGFP- (A-D), A-GFP- (E-H) und B-GFP- (I-L) transformierten Isolaten. Die Bilder sind jeweils im Abstand von 1 Tag aufgenommen, beginnend 24 h p.i. A, E, I: Bildung von Appressorien (Ap); B, F, J: primäre Hyphen (pHy); C, G, K: sekundäre Hyphen (sHy) und Sporenlager-Primordien (Ac); D, H, L: fertig ausgebildete Acervuli (Ac) mit nicht fluoreszierenden Setae (Se)

III.3 Ergebnisse der Geninaktivierungen

III.3.1 Einführung

Die Vorgehensweise zur Charakterisierung der *knock-out* Isolate war bei allen Genen identisch. Zunächst erfolgte der Nachweis der homologen Rekombination und der erfolgreichen Inaktivierung mittels PCR, Southern Blot und RT-PCR. Anschließend wurde eine makroskopische und mikroskopische Untersuchung des Phänotyps einschließlich der Bestimmung des Chitin-Gehalts durchgeführt sowie die Virulenz in Infektionstests überprüft.

III.3.2 *ChsA*

III.3.2.1 Nachweis der Inaktivierung

Die Transformation mit 4,5 µg des Inaktivierungsvektors (pTZΔ*ChsA*) ergab nach Umsetzen der primären Transformanden auf neue Hygromycin-haltige Selektionsplatten 27 Kolonien. Von diesen wurde wie im Methodenteil beschrieben DNA extrahiert und in verschiedenen PCR-Reaktionen auf erfolgreiche homologe Rekombination untersucht. Dabei wurden die Primerpaare CHSA1.1/CHSAr3, die das Wt-Allel zeigen, CHSAko/Ptrp, die spezifisch für die homologe Rekombination sind und CHSAr5/hph4, die die Integration der transformierten DNA inkl. Hygromycin-Resistenzkassette belegen, verwendet. Es zeigte sich, dass nur die Kolonien 10 und 22 die homologe Rekombination aufwiesen, obwohl auch diese noch eine schwache Bande beim Nachweis des Wt-Allels ergaben. Aufgrund der Vermutung, dass es sich hierbei um ein Heterokaryon handelt, also ein Mycel, das Kerne mit unterschiedlichen Allelen enthält, wurden von diesen beiden Kolonien Einzelsporisolate hergestellt, da in jeder Spore nur jeweils ein Kern enthalten ist. Als Kontrollen wurden auch von den Kolonien 1 und 6 solche Isolate erstellt, die vermutlich ektopische Integrationen des Vektors enthielten. Die PCR mit der DNA aus diesen Einzelsporisolaten lieferte nun ein eindeutiges Ergebnis (Abb. 3.9).

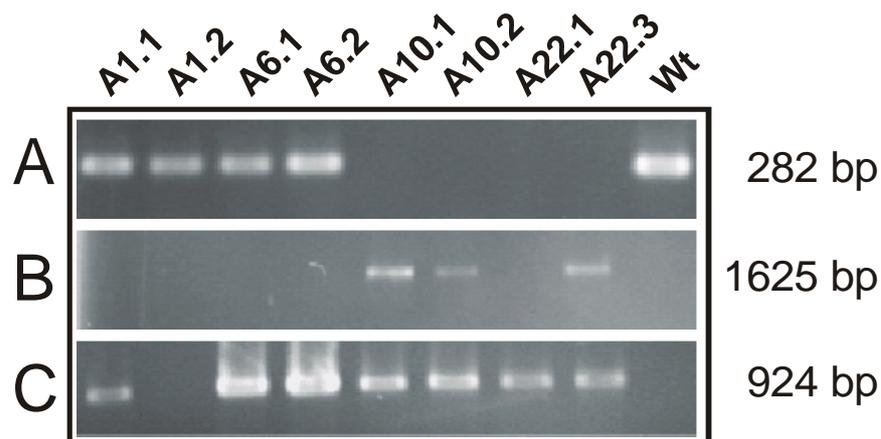


Abb. 3.9: PCR mit DNA von Einzelsporisolaten aus der *ChsA*-Inaktivierung. A zeigt den Nachweis des wt-Allels, B den Nachweis des mutierten Allels und C den Nachweis der DNA-Integration. Die Isolate A1 und A6 besitzen ektopische Integrationen, A10 und A22 sind *knock-out*-Mutanten.

Die zum Teil schwache Ausprägung der Banden beruht vermutlich auf der mangelhaften Qualität der DNA, die auf die Methode der schnellen DNA-Extraktion (siehe II.3.1.2) zurückzuführen ist. Besonders bei größeren Produkten, wie im Fall des Nachweises des mutierten Allels, führt dies bisweilen zu Problemen bei der Amplifikation (z.B. Abb 3.9, Isolat A22.1, Spur B und Isolat A1.2, Spur C).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden Southern Blot und RT-PCR Untersuchungen durchgeführt (Abb. 3.10). Der Southern Blot zeigt bei den Isolaten A10.2 und A22.1 das Fehlen der Wt-Bande bei 2282 bp. Stattdessen hybridisiert die Sonde wie erwartet an ein Fragment von 1524 bp. Isolat A6.2 zeigt eine multiple Integration der DNA, bei Isolat A1.1 findet sich neben dem Wt-Fragment nur eine zusätzliche Bande. Die RT-PCR weist die Transkripte von *ChsA* nur in den Isolaten A1.1 und A6.2, nicht aber in A10.2 und A22.1 nach.

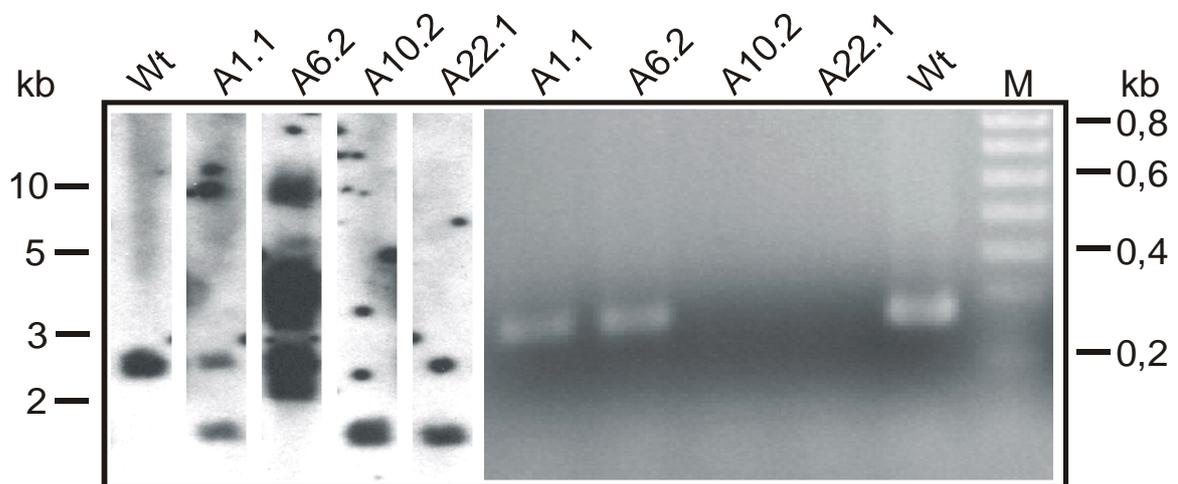


Abb. 3.10: Southern Blot und RT-PCR zum Nachweis der Inaktivierung von *ChsA*. Genomische DNA (BamHI-Verdau) wurde mit einer DIG-markierten *ChsA*-Sonde (PCR-Produkt mit Primern CHSAr1/CHSA3) geprobt (links). Die RT-PCR wurde mit den Primern CHSA1.1 und CHSAr3 (274 bp) durchgeführt, welche im deletierten Bereich des Gens liegen (rechts).

III.3.2.2 Phänotyp der Mutanten

Die knock-out Mutanten von *ChsA* zeigen makroskopisch keine Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 3.11). Sie weisen ebenfalls keine Unterschiede auf hinsichtlich ihrer Virulenz (Abb. 3.12) und der Anfärbbarkeit mit Calcofluor (Abb. 3.13) auf. Der Chitingehalt, gemessen über die GlcNAc-Menge, ist im Vergleich zum Wildtyp und zu Transformanden mit ektopischer Integration um ungefähr 10 % verringert (Tab. 3.2 und Abb. 3.14), was aber offensichtlich keine Auswirkungen auf den Phänotyp hat. Die Mengen der anderen Zuckermonomere sind nicht verändert. Insgesamt lässt sich sagen, dass *ChsA* entweder keine essentielle Aufgabe wahrnimmt, dieser Mangel durch die anderen Chitin Synthesen kompensiert werden kann oder nur in Phasen des Lebenszyklus (z.B. während der sexuellen Fortpflanzung) benötigt wird, die nicht untersucht wurden.

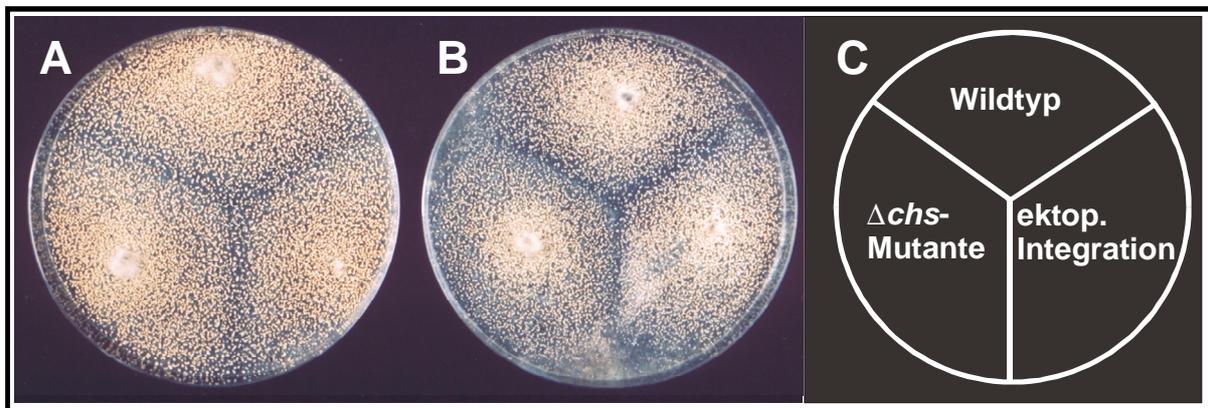


Abb. 3.11: Morphologie der $\Delta chsA$ - und $\Delta chsB$ - Mutanten auf Haferflockenmedium (A, B). Im oberen Sektor befindet sich der Wt (CgM2), rechts jeweils eine Transformante mit ektopischer Integration (A6.2 bzw. B37.2) und links die ko- Isolate (A22.1 bzw. B31.2)

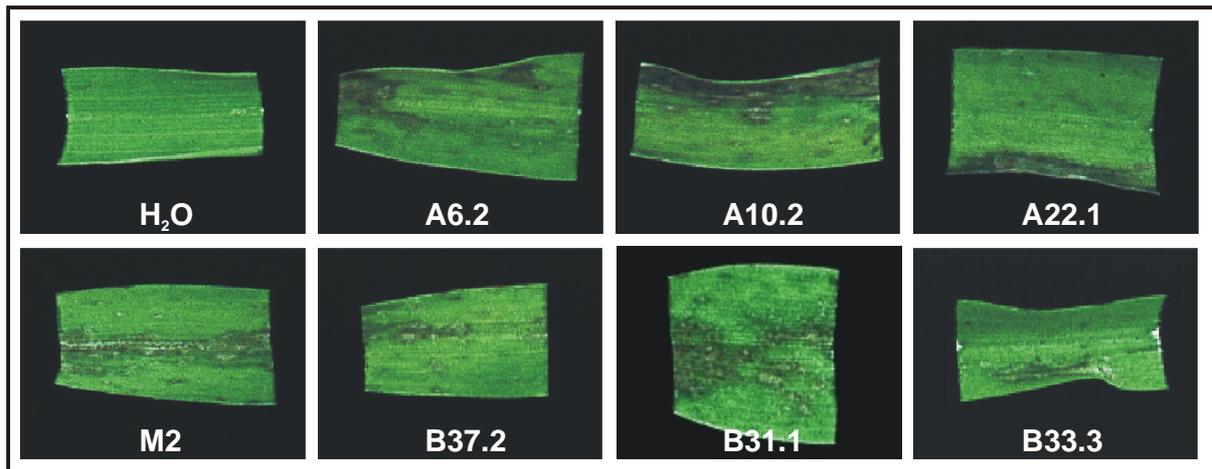


Abb. 3.12: Pathogenitätstest mit den Δ *chsA*- und Δ *chsB*-Mutanten. A6.2 und B37.2 besitzen ektopische Integrationen, A10.2, A22.1, B31.1 sowie B33.3 sind jeweils unabhängige ko-Isolate. Ganze Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension eingesprüht und die Symptome auf einzelnen Blättern nach 5 Tagen fotografiert.

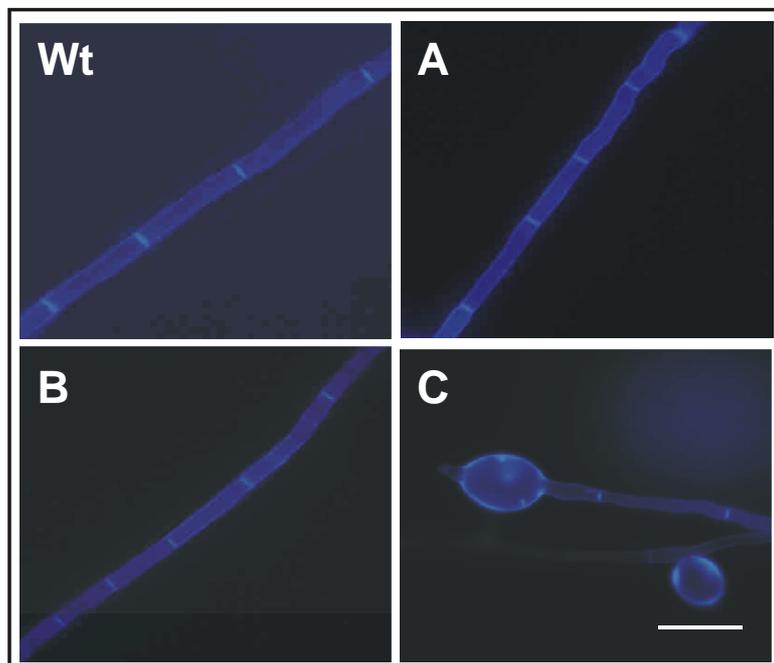


Abb. 3.13: Färbung der Chitin Synthase Mutanten mit Calcofluor White. In allen Fällen lassen sich Hyphenwände und Septen anfärben. Zur Morphologie der Δ *chsC*-Mutante siehe III.3.4.2. Folgende Isolate sind dargestellt: Wt = M2, A = A22.1, B = B33.3 und C = C21.1. Der Balken entspricht 10 μ m.

Isolat	GlcNAc [$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	Glucose [$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	Mannose [$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	Galactose [$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]
M2	67,3	598,6	58,8	67,8
A6.2	59,1	442,8	42,5	63,8
A10.2	56,5	599,2	55,4	70,2
A22.1	55,2	682,2	43,5	65,0
B31.1	57,7	526,5	48,6	76,3
B33.3	57,1	576,0	46,2	59,8
B37.2	68,4	756,5	60,8	72,9
C19.4	78,3	653,9	67,0	89,3
C20.1	43,4	580,6	22,1	46,6
C21.1	52,2	691,4	30,6	58,6

Tab. 3.2: Gehalt an Zuckermonomeren in den Zellwänden der verschiedenen Chitin Synthase Mutanten von *C. graminicola*

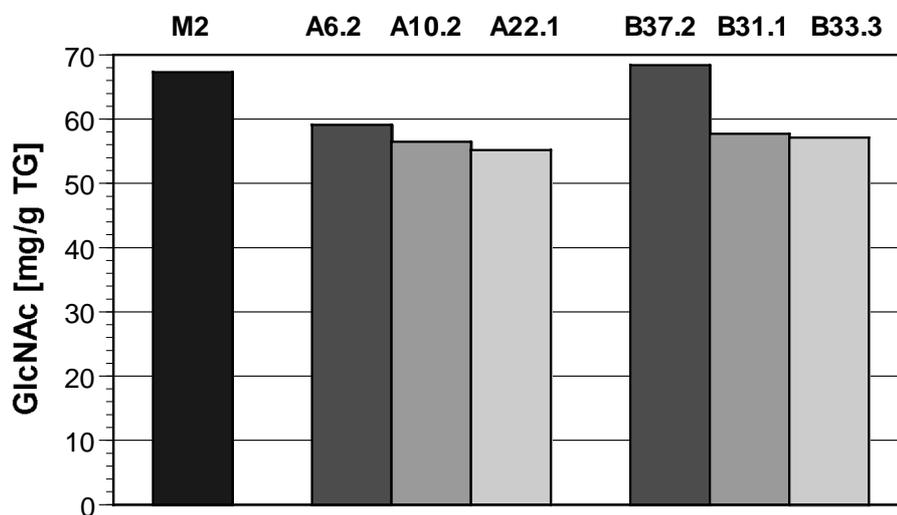


Abb. 3.14: N-Acetyl-Glucosamin Gehalte in den Zellwänden der $\Delta chsA$ - und $\Delta chsB$ -Mutanten (A6.2 und B37.2 besitzen ektopische Integrationen)

III.3.3 *ChsB*

III.3.3.1 Nachweis der Inaktivierung

Nach einer Transformation mit 1,5 µg PCR-Produkt, konnten insgesamt 38 Kolonien isoliert werden. Diese wurden mit den Primerpaaren CHSB2/CHSBr4 (Wt), Ptrp/CHSBr3 (Vektor) und Ptrp/CHSBko (homologe Rekombination) getestet. Dabei wurden zwei Isolate (B31 und B33) mit homologer Rekombination gefunden, die aber auch noch eine schwache Bande mit dem wt-Primerpaar ergaben. Daher wurden auch hier Einzelsporisolate hergestellt und diese nochmals in der PCR getestet. Dort zeigte sich dann das erwartete Ergebnis (Abb. 3.15):

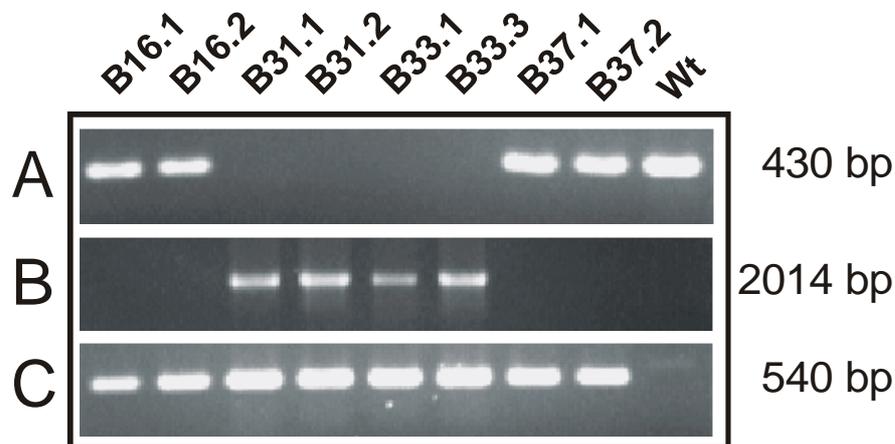


Abb. 3.15: PCR mit DNA von Einzelsporisolaten aus der *ChsB*-Inaktivierung. A zeigt den Nachweis des Wt-Allels, B den Nachweis des mutierten Allels und C den Nachweis der DNA-Integration. Die Isolate B16 und B37 besitzen ektopische Integrationen, B31 und B33 sind *knock-outs*.

Neben diesen PCR-Untersuchungen wurden auch Southern Blot- und RT-PCR-Tests durchgeführt (Abb. 3.16). Der Southern Blot bestätigte das Ergebnis der obigen PCR's. Nach Acc65 I/Xho I-Verdau findet man bei den ko-Mutanten anstelle der Wt-Bande bei 1,8 kb eine Bande bei 3,6 kb. Die Isolate B16.1 und B37.2 weisen neben der Wt-Bande ein weiteres Signal bei >10 kb bzw. bei ca. 3,4 kb auf, was auf die ektopische Integration des Vektors zurückzuführen ist. Die RT-PCR zeigt, dass in den knock-outs keine Transkripte von *ChsB* mehr gebildet werden.

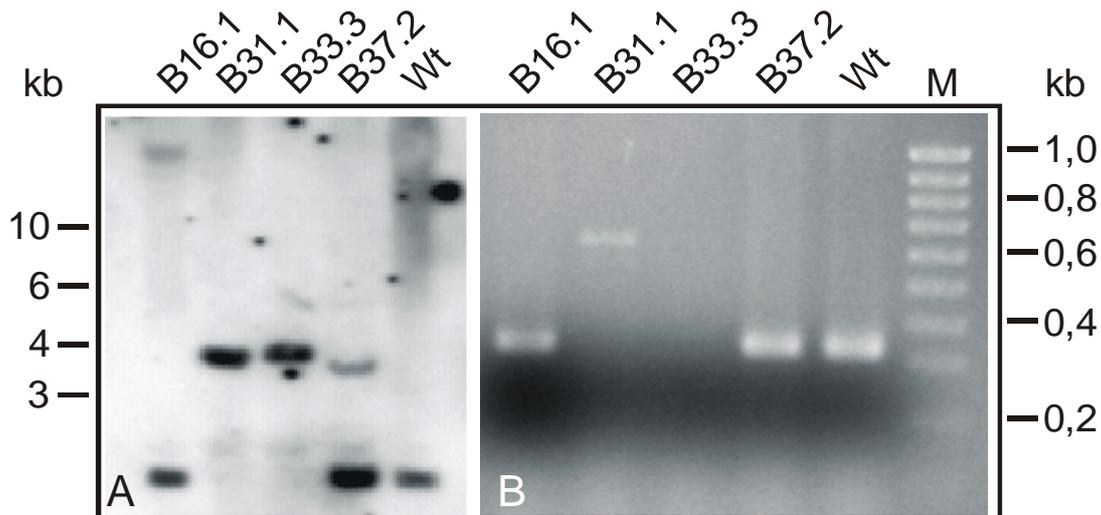


Abb. 3.16: Southern Blot (A) und RT-PCR (B) zum Nachweis der Inaktivierung von *ChsB*. Genomische DNA (Acc65 I/Xho I-Verdau) wurde mit einer DIG-markierten *ChsB*-Sonde (PCR-Produkt mit Primern CHSB6/CHSBr7) geprobt (A). Die RT-PCR wurde mit den Primern CHSB4 und CHSBr5 (328 bp) durchgeführt, welche im deletierten Bereich des Gens liegen (B).

III.3.3.2 Phänotyp der Mutanten

Für die $\Delta chsB$ -Mutanten gilt im Wesentlichen dasselbe wie für die $\Delta chsA$ -Mutanten: Der Koloniephänotyp und die Virulenz unterscheiden sich nicht vom Wildtyp (Abb. 3.11 und 3.12). Der GlcNAc-Gehalt der Zellwand ist um ca. 15 % reduziert, doch auch hier zeigt sich kein Unterschied in der Calcofluor-Färbung (Tab. 3.2 sowie Abb. 3.13 und 3.14). Neben GlcNAc ist auch der Mannose-Gehalt etwas geringer (ca. 80 % vom Wt). Ob allerdings ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Werten besteht, läßt sich aufgrund des geringen Probenumfangs nur schwer sagen.

III.3.4 ChsC

III.3.4.1 Nachweis der Inaktivierung

Ausgehend von einer Transformation mit 10 µg Plasmid konnten 24 Kolonien isoliert werden. Einen ersten Hinweis auf den Erfolg der Inaktivierung lieferte die Tatsache, dass 13 der 24 Hygromycin-resistenten Kolonien nach Umsetzen auf Standard-Haferflockenmedium nicht mehr wuchsen. Das Wachstum konnte aber durch Zugabe von osmotisch aktiven Substanzen wie Saccharose oder KCl wieder hergestellt werden (Abb. 3.17).

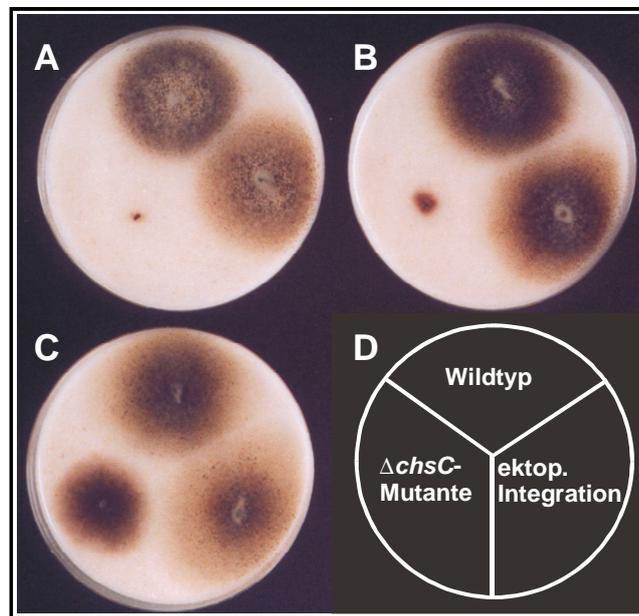


Abb. 3.17: Wiederherstellen des Wachstums einer $\Delta chsC$ -Mutante mittels Supplementierung des Mediums mit KCl. A zeigt normalen Haferflockenagar ohne Salzzusatz, bei B wurden 50 mM und bei C 150 mM KCl zugegeben. Oben ist jeweils der Wildtyp zu sehen, rechts eine Transformante mit ektoischer Integration und links eine ko-Mutante.

Von 4 dieser Kolonien wurden wiederum Einzelsporisolate hergestellt und mittels PCR der Nachweis der homologen Rekombination geführt (Abb. 3.18). Dabei wurden die Primer CHSC2.2/CHS5 (Wt), pUC18/CHSCko (*knock-out*) und M13universal/CHSCr1 (Vektor) eingesetzt.

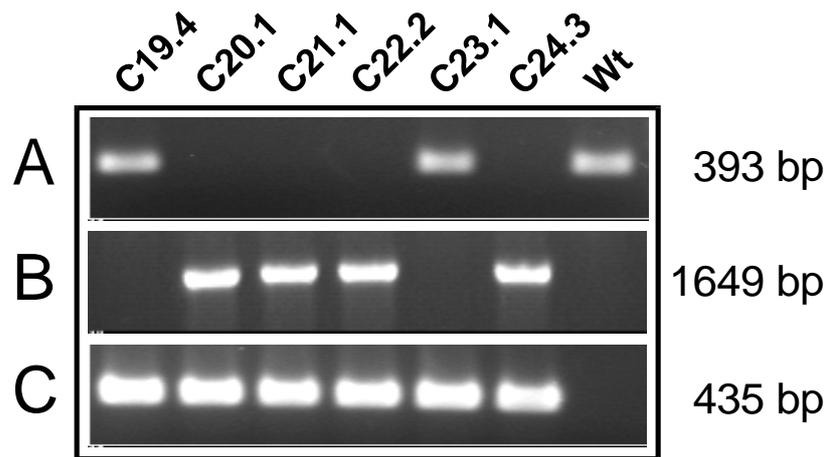


Abb. 3.18: PCR mit DNA von Einzelsporisolen aus der *ChsC*-Inaktivierung. A zeigt den Nachweis des wt-Allels, B den Nachweis des mutierten Allels und C den Nachweis der DNA-Integration. Die Isolate C19.4 und C23.1 besitzen ektopische Integrationen, C20.1, C21.1, C22.2 und C24.3 sind ko-Mutanten.

Zur weiteren Verifizierung wurden wie bei den anderen Transformanden Southern Blot und RT-PCR-Untersuchungen vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 zu sehen. Die ko-Mutanten weisen keine Hybridisierung mehr in Höhe der Wt-Bande auf und besitzen kein vollständiges *ChsC*-Transkript mehr. Die Transformanden C19.4 und C23.1 mit ektopischer Integration besitzen ein bis mehrere Kopien des Vektors und stellen noch *ChsC*-mRNA her.

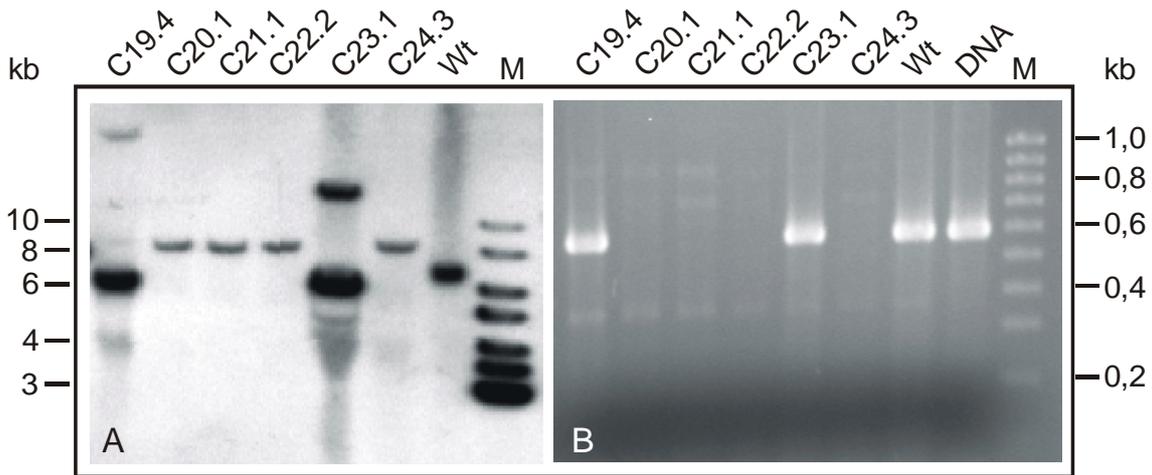


Abb. 3.19: Southern Blot (A) und RT-PCR (B) zum Nachweis der Inaktivierung von *ChsC*. Genomische DNA (HindIII-Verdau) wurde mit einer DIG-markierten *ChsC*-Sonde (PCR-Produkt mit Primern CHSC2.1/CHSCr1) geprobt (A). Die RT-PCR wurde mit den Primern CHSC3 und RTC2 (585 bp) durchgeführt, welche im deletierten Bereich des Gens liegen (B).

III.3.4.2 Phänotyp der Mutanten

Wie oben erwähnt, bestand die erste Auffälligkeit der $\Delta chsC$ -Mutanten in der Tatsache, dass ein Wachstum auf bzw. in normalem Medium nicht mehr möglich war. Erst nach Zugabe von Salzen oder Zucker zur osmotischen Stabilisierung kam es zu einem in der Geschwindigkeit nur unwesentlich geringerem Wachstum. Die Bildung von Luftmyzel war dabei deutlich geringer als beim Wildtyp, die Ausbildung von Acervuli unterblieb vollständig. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten sich starke strukturelle Anomalien der Hyphen (Abb. 3.20). Über die gesamte Hyphenlänge kommt es zur Ausbildung blasiger Strukturen, das typische filamentöse Erscheinungsbild ist nicht mehr gegeben. Auffallend ist die Ähnlichkeit zum Phänotyp nach Nikkomycin Z-Behandlung (siehe Abb. 3.3), auch wenn dort die Ausprägung der blasigen Struktur nicht ganz so stark ist. Das Mycel weist einen hohen Verzweigungsgrad auf.

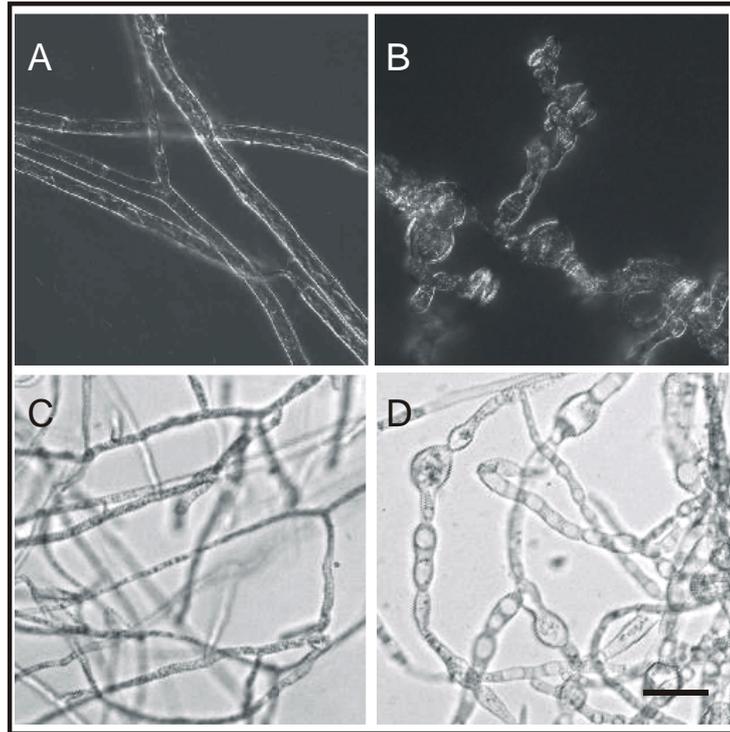


Abb. 3.20: Mikroskopische Aufnahme von Hyphen beim Wachstum auf festem Medium (A, B, Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast) bzw. in Flüssigmedium (C, D, Hellfeldaufnahme). Die Agarplatten wurden mit 0,5 M Saccharose, das Flüssigmedium mit 1 M Sorbitol osmotisch stabilisiert. A und C zeigen den Wildtyp, B und D die Mutante C21.1. Der Balken entspricht 10 μm .

Es zeigte sich, dass der GlcNAc-Gehalt der Zellwände um ungefähr 30 % reduziert ist (Tab. 3.2 und Abb. 3.21) und auch die Anfärbung mit Calcofluor zeigt eine gewisse Reduktion in der Fluoreszenz der Hyphenwände (Abb. 3.13). Auffällig ist bei den $\Delta chsC$ -Mutanten die starke Verringerung im Mannose-Gehalt der Zellwände, der nur noch ca. 42 % des Wt-Werts erreicht (Tab. 3.1 und Abb. 3.21).

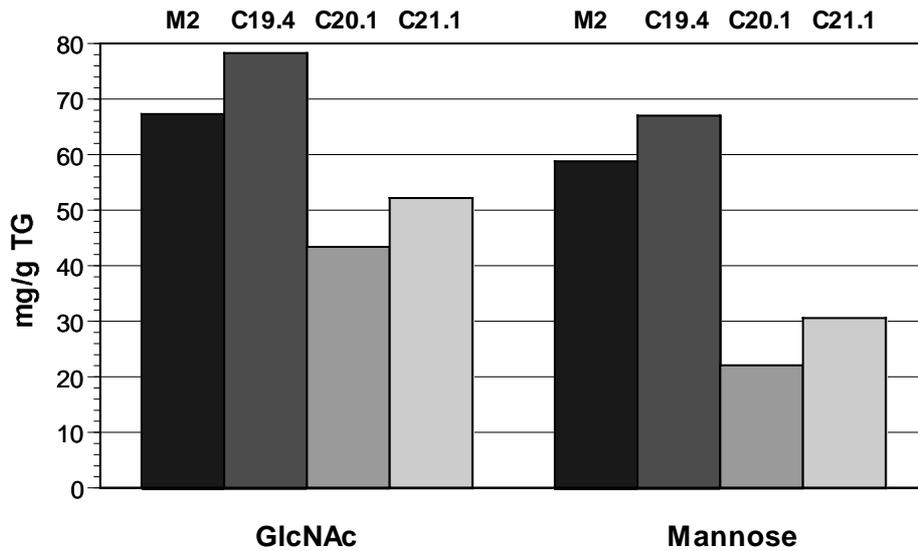


Abb. 3.21: GlcNAc- und Mannose-Gehalt in den Zellwänden der $\Delta chsC$ -Mutanten (C20.1 und C21.1) im Vergleich zu Wt und ectopischer Integration (M2 und C19.4)

Die Untersuchung von Infektionsstrukturen erwies sich zunächst aufgrund der fehlenden Sporulation als schwierig. Zwar wurde später festgestellt, dass beim Wachstum in speziellem Flüssigmedium (0,5 M Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt) große Mengen ovaler Sporen gebildet werden, allerdings konnten diese nicht zur Bildung von Appressorien genutzt werden. In verdünnter Kartoffeldextrose-Lösung kam es zwar zur Keimung, der Keimschlauch schwell aber sofort stark an und lysierte. In osmotisch stabilisierender Saccharoselösung (0,5 – 1 M) kam es zwar auch zur Keimung, hier ging der Pilz aber sofort zu vegetativem Wachstum über (Abb 3.22).



Abb. 3.22: Keimung von Sporen einer $\Delta chsC$ -Mutante (C21.1) in stark verdünnter Kartoffeldextrose (A) bzw. in 0,5 M Saccharose (B). Als Vergleich dient in beiden Fällen der Wildtyp (C und D). Sp = Spore, Ap = Appressorium, Hp = Hyphopodium, Balken entspricht 10 μm .

Erst die Tatsache, dass von vegetativen Hyphen bei Kontakt zu einer festen Oberfläche Hyphopodien gebildet werden, die strukturell und funktionell den Appressorien entsprechen, ermöglichte die Untersuchung des Infektionsverhaltens der $\Delta chsC$ -Mutanten. Dazu wurden kleine Myzelstückchen in einem Tropfen osmotisch stabilisierter Lösung (0,5 M Saccharose) auf Maisblätter bzw. künstliche Unterlagen gesetzt, von welchen ausgehend sich Hyphen über die Oberfläche ausbreiteten, an deren Ende sich dann Hyphopodien bildeten (Abb. 3.22 und 3.23). Interessanterweise werden bei der Bildung von Hyphopodien häufig auch schon die unmittelbar davor liegenden Zellen melanisiert. Die Hyphopodien der Mutanten waren im Vergleich zu den meist stark gelappten des Wildtyps deutlich runder und teilweise auch größer.



Abb. 3.23: Hyphopodien von Wildtyp (A) und $\Delta chsC$ -Mutante (B) im Vergleich. Balken entspricht 10 μm .

III.3.4.3 Infektionsversuche

Die Infektionsversuche wurden ebenfalls mit kleinen Mycelstückchen durchgeführt, die auf die Blätter gesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass die Mutanten nicht mehr in der Lage sind, intakte Blätter zu besiedeln (Abb. 3.24). Wurden die Blätter hingegen zuvor mit einer Präpariernadel verletzt, war ein geringes Wachstum möglich. Dieses beschränkte sich aber auf den durch den Saccharosetropfen bedeckten Bereich.

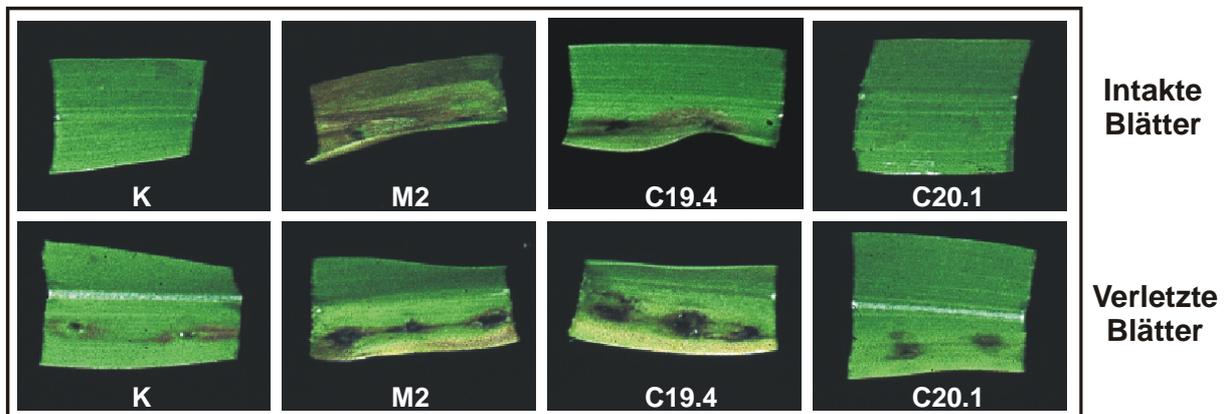


Abb. 3.24: Infektionsversuch mit der $\Delta chsC$ -Mutante. Eine Infektion findet nicht mehr statt. Die Blätter in der unteren Reihe wurden vor der Inokulation mit einer Präpariernadel verletzt. Als Kontrolle diente der Wt (M2) und Tropfen mit Saccharoselösung ohne Mycel (K). C19.4 besitzt eine ektopische Integration und verhält sich wie der Wt, C20.1 ist der *knock-out*.

IV Diskussion

IV.1 *C. graminicola* als Modellorganismus für pflanzenpathogene Pilze

C. graminicola wurde aus mehreren Gründen für die vorliegende Arbeit gewählt. Zum einen handelt es sich hier um ein Pathogen, das in der Lage ist, intakte Pflanzenzellen direkt zu penetrieren. Dazu werden definierte Infektionsstrukturen (Appressorien) gebildet, deren Funktionsweise bis heute nicht vollständig verstanden ist, deren Bedeutung für eine erfolgreiche Besiedlung des Wirtsgewebes aber außer Frage steht (Deising *et al.*, 2000).

Insbesondere die Bedeutung von Chitin bzw. der Chitin-bildenden Enzyme für die Pathogenese fand bei phytopathogenen Organismen mit Ausnahme des Getreidemehltaus *Blumeria graminis* und des Maisbeulenbrandes *Ustilago maydis* bisher kaum Beachtung (Chavez-Ontiveros *et al.*, 2000 und Referenzen darin; Zhang *et al.*, 2000). Gegenüber dem obligat biotrophen Mehltau bietet *C. graminicola* den Vorteil, dass eine gezielte Inaktivierung von Genen möglich ist, die eine essentielle Rolle während der Pathogenese spielen. Besonders bei Multi-Gen Familien wie den Chitin Synthasen lassen sich nur auf diesem Weg die Funktionen einzelner Gene bestimmen. Der Vorteil gegenüber *U. maydis* besteht zum einen darin, dass *C. graminicola* klar differenzierte Infektionsstrukturen ausbildet und zum anderen im Vorliegen einer haploiden Kernphase während des Großteils des Lebenszyklus, die die genetische Manipulation erleichtert. Ein weiterer Vorteil von *C. graminicola* ist der hohe Turgordruck in den Appressorien, so dass es leicht möglich ist, den Effekt von Mutationen auf die Rigidität der Zellwände zu beurteilen.

Die erzielten Ergebnisse lassen sich anschließend in gewissem Grad auf andere ökonomisch bedeutende *Colletotrichum* Arten oder auf das Reispathogen *Magnaporthe grisea* übertragen, die dem gleichen Infektionsprinzip folgen.

IV.2 Versuche mit CHS-Inhibitoren bei pflanzenpathogenen Pilzen

Bislang gibt es nur wenige (öffentlich zugängliche) Untersuchungen zur Wirkung von Chitin Synthase-Inhibitoren auf pflanzenpathogene Pilze. Einzige Ausnahme stellt der Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* dar (Zhang *et al.*, 2000). Hier zeigte sich, dass sowohl Polyoxin D als auch Nikkomycin Z einen starken Einfluss auf die Bildung des sekundären (Appressorien-) Keimschlauchs haben. Beide verursachen ein starkes

Anschwellen der Keimschläuche, was – zumindest bei Polyoxin D - auch bis zum Aufplatzen der Strukturen führen kann. Die Zahl normal differenzierter Keimschläuche und Appressorien war dadurch stark vermindert. In dieser Arbeit wird jedoch keine Aussage über die Penetrationsrate in den behandelten Ansätzen gemacht. Interessanterweise scheint der primäre Keimschlauch von der Behandlung nicht beeinträchtigt zu sein, obwohl gezeigt werden konnte, dass die Transkription der beiden bisher bekannten *Chs*-Gene in diesem Stadium erhöht ist. Andererseits muss natürlich eine erhöhte Transkription nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Proteinmenge oder Enzymaktivität führen. Diese könnte dann erst zum Zeitpunkt der Bildung des sek. Keimschlauchs vorliegen, was dann wiederum in guter Übereinstimmung mit den Inhibitorversuchen stünde.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der vorliegenden Arbeit erzielt. Die Behandlung mit Nikkomycin Z führt bei *C. graminicola* zu einem starken Anschwellen der Keimschläuche und Appressorien und bei hohen Konzentrationen des Inhibitors auch zu einem Aufplatzen und Kollabieren dieser Strukturen.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, weshalb CHS-Inhibitoren nicht als kommerzielle Präparate im Pflanzenschutz erhältlich sind, zumal sie bedingt durch Ihren Wirkort auch spezifisch auf Pilze und eventuell Insekten wirken (siehe Tellam *et al.*, 2000).

Dafür gibt es mehrere Gründe. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die einzelnen CHS-Isozyme unterschiedlich empfindlich gegenüber diesen Wirkstoffen und es kommt fast nie zu einer vollständigen Hemmung der Chitin Synthese. Somit wäre ein Mittel auf dieser Basis vermutlich nur gegen wenige Pathogene wirksam, wenn auch z.B. gegen wichtige Pathogene wie den Getreidemehltau (s.o.). Ferner muss der Wirkstoff in die Zelle aufgenommen werden, was sich z.T. als problematisch herausstellte (McCarthy *et al.*, 1985) und eine mögliche Quelle für Resistenzbildung darstellt. Ein weiteres wichtiges Hindernis für den Einsatz im Pflanzenschutz besteht in der potentiellen Verwendung dieser Wirkstoffe in der Humanmedizin. Hier besteht ein großer Bedarf an neuen antifungal wirkenden Medikamenten und es gibt bereits einige Arbeiten, die sich mit der Modifizierung der Nikkomycin-/Polyoxin-Grundstruktur beschäftigen (Krainer *et al.*, 1991; Zhang & Miller, 1999). Gleichzeitig wird auch nach weiteren Wirkstoffen gesucht, die die Chitin Synthese inhibieren (Sudoh *et al.*, 2000). Ein Einsatz von Wirkstoffen aus der Humanmedizin im Pflanzenschutz ist natürlich nicht ohne weiteres möglich.

IV.3 Chitin Synthasen: eine Multi-Gen-Familie

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besitzen die meisten bislang untersuchten pilzlichen Organismen mehrere Gene, die für die katalytischen Einheiten von Chitin Synthasen kodieren. Bei den gut untersuchten Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* wurden bislang je drei Gene isoliert und charakterisiert, aus filamentösen Pilzen sind bis zu zehn solcher Gene in einem Organismus beschrieben worden (Miyazaki & Ootaki, 1997). Auch *C. graminicola* bildet in dieser Hinsicht keine Ausnahme. In der vorliegenden Arbeit konnten in diesem Pilz vier verschiedene Gene belegt werden, wovon drei vollständig isoliert und charakterisiert wurden. Die Möglichkeit, dass noch weitere *Chs*-Gene im Genom von *C. graminicola* vorhanden sind, wurde nicht abschließend untersucht.

IV.3.1 Funktion einzelner Gene

IV.3.1.1 Übersicht

Schon Mitte der 80er Jahre stellte man erstmals bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* fest, dass die Chitin Synthase-Aktivität eines Organismus von mehreren Enzymen und damit auch mehreren Genen vermittelt wird (Orlean, 1987; Sburlati & Cabib, 1986), was bereits damals zu Spekulationen über die Funktion der einzelnen Enzyme im Lebenszyklus von *S. cerevisiae* führte. Inzwischen sind die Untersuchungen an diesem Modellorganismus weit fortgeschritten (siehe Einleitung) und es wurde klar, dass die Aktivität der einzelnen Isoformen einer genauen zeitlichen und räumlichen Regulation unterliegt, wobei jedes Enzym eine spezifische Aufgabe wahrnimmt. Auf der anderen Seite wurde aber auch deutlich, dass Defekte in einzelnen Genen zwar auch morphologisch sichtbare Effekte nach sich ziehen, dass aber auch die Inaktivierung eines oder zweier Gene nicht zu einem vollständigen Vitalitätsverlust führt.

Eine ähnliche Situation stellt sich bei den filamentösen Pilzen dar, wobei hier die Lage, bedingt durch die meist höhere Zahl an Genen und die höhere Komplexität der Lebensformen, noch komplizierter ist. Hinzu kommt, dass zahlreiche filamentöse Pilze nicht oder nur schlecht gentechnischen Methoden zugänglich sind, so dass die meisten Ergebnisse auch hier an Modellorganismen wie *Neurospora crassa* und *Aspergillus spec.* gewonnen wurden. Insgesamt ist aber der Kenntnisstand über die Funktion einzelner Gene bei diesen Organismen, und das gilt insbesondere für pflanzenpathogene Pilze, weitaus geringer als bei den Hefen.

Die Untersuchungen wurden meist mittels gezielter Inaktivierung einzelner Gene durchgeführt. Dabei konnte häufig kein oder nur ein minimaler Unterschied zum Wachstum und der Morphologie des entsprechenden Wildtyps festgestellt werden (z.B. Din & Yarden, 1994; Mellado *et al.*, 1996b; Motoyama *et al.*, 1994), was vermutlich an einer gewissen Redundanz der Genfunktion liegt. Eine solche Redundanz konnte z.B. für die Gene *ChsA*, *ChsC* und *ChsD* von *A. nidulans* gezeigt werden. Während Inaktivierung von *ChsC* und *ChsD* sowohl einzeln als auch in Kombination keinen sichtbaren Effekt auf Morphologie und Entwicklung des Pilzes hatte (Motoyama *et al.*, 1997; Motoyama *et al.*, 1994), konnte nach Inaktivierung von *ChsA* eine Reduktion der Konidienbildung um ca. 70 % festgestellt werden, wobei die Morphologie der noch gebildeten Konidiophoren und Konidien nicht beeinträchtigt war (Culp *et al.*, 2000). Wurden hingegen Doppelmutanten in *ChsA* und *ChsC* bzw. *ChsA* und *ChsD* erzeugt, hatte dies drastische Effekte. Im ersten Fall kam es sowohl zu leichten Störungen in der Zellwand vegetativer Hyphen, was sich in höherer Empfindlichkeit gegenüber Salzen und CHS-Inhibitoren äußerte, als auch zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Konidienbildung (<0,01 %). Gleichzeitig wiesen die noch vorhandenen Konidiophoren starke strukturelle Missbildungen auf (Fujiwara *et al.*, 2000). Im zweiten Fall ($\Delta chsA/\Delta chsD$) wurde ein Rückgang der Sporulation auf 3-10 % vom Normalwert festgestellt, ohne dass Morphologie und Lebensfähigkeit der Sporen beeinträchtigt waren (Culp *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 1997).

Ein hohes Maß an Redundanz findet sich auch beim Erreger des Maisbeulenbrands, *Ustilago maydis*. Von insgesamt sechs Genen wurden fünf mittels Inaktivierung untersucht, wobei nur bei $\Delta chs5$ eine messbare Reduktion in Wachstumsrate, Chitin-Gehalt und Virulenz auftrat (Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997). Auch die drei Doppelmutanten $\Delta chs1/\Delta chs2$, $\Delta chs3/\Delta chs4$ sowie $\Delta chs4/\Delta chs5$ zeigten keinen über das Maß der Einzelmutanten hinausgehenden Phänotyp (Chavez-Ontiveros *et al.*, 2000; Gold & Kronstad, 1994).

Ganz im Gegensatz zu den eben erläuterten Resultaten finden sich auch einige Gene, deren Funktion (nahezu) essentiell für das Wachstum ist, oder die zumindest wichtige Funktionen für die Stabilität der Zellwand und somit die Morphologie des jeweiligen Organismus haben. Mutationen in diesen Genen bewirken eine deutliche Reduktion des (Hyphen-) Wachstums und gehen meist auch mit starken morphologischen Defekten einher. Zu diesen Genen gehören *Chs1* aus *C. albicans* (Munro *et al.*, 2001), *Chs1* aus *N. crassa* (Yarden & Yanofsky, 1991), *ChsG* aus *A. fumigatus* (Mellado *et al.*, 1996a), sowie *ChsB* und *CsmA* aus *A. nidulans* (Borgia *et al.*, 1996; Horiuchi *et al.*, 1999; Yanai *et al.*, 1994). Bei den filamentösen Pilzen ist auffällig, dass drei der vier genannten Gene zur Klasse III der Chitin Synthasen zählen und

das vierte zu Klasse V. Beide Klassen existieren nicht in Hefen und man kann vermuten, dass diese Gene unmittelbar mit der filamentösen Wachstumsform in Verbindung stehen.

Die Tatsache, dass in diesen Klassen aber auch Gene vorkommen, die keine offensichtliche Funktion besitzen (z.B. *ChsD* und *ChsC* aus *A. fumigatus*; Mellado *et al.*, 1996a; Mellado *et al.*, 1996b), macht allerdings eine differenzierte Betrachtung der Situation in jedem einzelnen Organismus notwendig. Dies wird auch durch das Beispiel von *Chs1* aus *C. albicans* unterstrichen. Obwohl eine hohe Homologie zu *Chs2* aus *S. cerevisiae* besteht und auch eine funktionelle Komplementierung möglich ist, handelt es sich im einen Fall (*C. albicans*) um ein essentielles Gen, im anderen Fall (*S. cerevisiae*) treten nach Inaktivierung nur geringe morphologische Änderungen auf (Munro *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 1991).

Eine mögliche Erklärung für die hohe Redundanz der *Chs*-Gene wäre, dass die Chitin Synthese für den Organismus von so essentieller Bedeutung ist, dass es notwendig ist, diese Funktion durch die Bereitstellung mehrerer Gene abzusichern. Darüberhinaus könnten einzelne Gene dann noch Spezialaufgaben wie z.B. bei der Sporulation übernehmen.

IV.3.1.2 *Chs*-Gene von *C. graminicola*

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls versucht, über die Inaktivierung einzelner *Chs*-Gene Rückschlüsse auf deren Funktion für Wachstum und Entwicklung zu ziehen. Dieses Ziel wurde für drei der (mindestens) vier Gene erreicht und dabei folgendes festgestellt:

Zwei der Gene – *ChsA* und *ChsB* – besitzen für sich alleine keine offensichtliche Funktion für den Pilz. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ihre Aufgabe in den Mutanten von den anderen Isozymen übernommen wird. Dies würde bedeuten, dass diese Gene eigentlich eine sehr wichtige Funktion erfüllen, da der Pilz gleich mehrere Gene für deren Erfüllung bereitstellt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass diese Enzyme nur in ganz bestimmten Stadien des Lebenszyklus benötigt werden, die bei den vorliegenden Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden, z.B. bei der sexuellen Entwicklung. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch, dass sich die Transkripte dieser Gene auch während des normalen vegetativen Wachstums nachweisen lassen (siehe auch IV.3.3). Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass die Syntheseprodukte dieser Enzyme nur eine kleine Fraktion des gesamten Chitins der Zellwand darstellen und deren Wegfall keinen Einfluss auf das Wachstum hat. Dies scheint tatsächlich der Fall zu sein, da die Mutanten nur eine Reduktion von 10-15 % im GlcNAc-Gehalt aufweisen.

Obwohl CgChsB sehr hohe Homologie zu Chs1 von *N. crassa* und ChsB von *A. nidulans* aufweist (71 % bzw. 67 % Identität auf Proteinebene) und somit ein Klasse III Gen darstellt,

sind die Auswirkungen einer Inaktivierung völlig unterschiedlich. Während die beiden letztgenannten Gene essentiell für das normale Wachstum der jeweiligen Organismen sind (siehe oben), scheint *CgChsB* keine lebensnotwendige Funktion zu erfüllen. Dies bestätigt erneut die schwierige Übertragbarkeit der Daten von einem Organismus auf den anderen.

Ein völlig anderes Bild zeigt sich bei *CgChsC*. In dieser Klasse gab es bislang nur ein Gen, das mittels Inaktivierung untersucht wurde, nämlich *CsmA* von *A. nidulans* (Horiuchi *et al.*, 1999). Bei diesem Pilz zeigten sich zwar starke Auffälligkeiten, wie z.B. ein unregelmäßiges Aussehen der Hyphen mit gelegentlich auftretenden ballonartigen Ausstülpungen, eine unregelmäßige Septierung, eine erhöhte Sensitivität gegenüber Chitin-bindenden Substanzen (Calcofluor White, Kongo-Rot) sowie eine geringe Ausbildung von Lufthyphen und Sporenträgern. Das Wachstum war jedoch nur geringfügig verzögert. Bei *CgChsC* hingegen handelt es sich um ein essentielles Gen. Das Wachstum der Mutanten auf normalen Nährmedien ist nicht mehr möglich. Lässt man Sporen in Wasser auskeimen, führt das zu einer großen blasenartigen Ausstülpung des Keimschlauchs und nachfolgender Lyse. Die Zugabe von osmotisch aktiven Substanzen (z.B. 1 M Saccharose, 1,2 M Sorbitol, 0,6 M KCl) ermöglicht zwar ein Wachstum der Mutanten, allerdings sind auch unter diesen Bedingungen starke morphologische Störungen sichtbar. Die Hyphen bilden auf ihrer gesamten Länge blasige Strukturen, die Ausbildung von Luftmycel ist stark vermindert und Sporenlager werden nicht mehr gebildet.

Der Chitin-Gehalt der Mutanten ist nur mäßig verringert (auf ca. 70 % des Wt). Dies allein reicht zur Erklärung des Phänotyps nicht aus, da solche Reduktionen schon bei anderen, phänotypisch nicht auffälligen Mutanten auftraten (z.B. $\Delta chsD$ von *A. fumigatus*, Mellado *et al.*, 1996b). Es ist allerdings möglich, dass die betroffene Chitin-Fraktion wichtige Aufgaben für die strukturelle Vernetzung der Zellwand erfüllt. Einen Hinweis darauf bietet die Tatsache, dass auch der Mannose-Gehalt stark reduziert ist (auf ca. 50 %). Da dieser Zucker hauptsächlich in Form von Mannoproteinen vorliegt, werden diese Proteine entweder in geringerer Anzahl produziert oder sie verlieren ihre Bindung zur Zellwand und gehen bei der Präparation der Wände verloren. Eine geringe Vernetzung der Zellwandpolymere könnte einen Verlust an struktureller Integrität zur Folge haben.

IV.3.2 Struktur der Chs-Proteine

Die Primärstruktur der Chitin Synthasen, wie sie sich aus den DNA-Sequenzen ableiten lässt, ist stark konserviert und auch die *C. graminicola* Enzyme bilden in dieser Hinsicht keine Ausnahme. Einem eher hydrophilen N-Terminus folgt ein neutraler mittlerer Teil, der in einen hydrophoben C-Terminus mit mehreren membranspannenden Domänen übergeht. Die Zahl der Membrandomänen lässt sich mit Hilfe von Computerprogrammen im Fall von *C. graminicola* auf 6-9 beziffern, was in guter Übereinstimmung mit den Daten aus anderen Pilzen liegt (z.B. Cabib *et al.*, 1996). Eine genauere Angabe ist schwierig, da diese Zahlen geringfügig mit dem jeweils benutzten Programm variieren. So erhält man z.B. für ChsA sieben TM-Domänen, wenn man die Sequenz mit dem TMHMM Programm am Server der TU Dänemark⁴ analysiert und neun Transmembran-Domänen mit dem TMPred Programm am EMBnet-Server in der Schweiz⁵.

Der N-Terminus scheint für die Funktion nicht bedeutend zu sein (mit Ausnahme der Enzyme vom Csm-Typ), die C-terminale Hälfte hingegen enthält die konservierten Bereiche mit den katalytischen Domänen (Ford *et al.*, 1996; Nagahashi *et al.*, 1995; Yabe *et al.*, 1998), die bei *S. cerevisiae* Chs2p als con1 und con2 bezeichnet wurden.

Con1 enthält die beiden Motive „EDR“ (Glu-Asp-Arg) und „QRRRW“ (Gln-Arg-Arg-Arg-Trp), wobei selbst konservative Aminosäure-Substitutionen des Aspartat in „EDR“ sowie des Glutamin, des dritten Arginin und des Tryptophan in „QRRRW“ die enzymatische Aktivität drastisch reduzierten ohne die Substratbinde-Eigenschaften (gemessen über den K_m -Wert der Reaktion) zu beeinflussen (Nagahashi *et al.*, 1995). Diese Motive finden sich auch in allen *C. graminicola* Proteinen (siehe Anhang). In con2 konnten weitere essentielle Aminosäuren definiert werden, die in dem Motiv „HDXSWG \underline{T} “ (His-Asp-X-Ser-Trp-Gly-Thr) angeordnet sind (Yabe *et al.*, 1998). Hiervon waren Histidin, Aspartat, Tryptophan und Threonin auch durch konservative Substitutionen nicht in ihrer Funktion zu ersetzen, wiederum ohne Einfluss auf den K_m -Wert. Dieses Motiv findet sich in allen Klasse I-III Enzymen, so auch in *C. graminicola* ChsA und ChsB. Im Gegensatz dazu sind die Klasse IV und V Enzyme in diesem Bereich weniger stark konserviert, obwohl sich meist ein Motiv mit der Konsensussequenz „DXSWG \underline{X} \underline{T} “ findet. Ein Histidin-Rest kurz davor findet sich bevorzugt in den Klasse V Enzymen, so auch bei *C. graminicola* ChsC, wo dieser Bereich die Sequenz „ \underline{H} \underline{M} \underline{D} \underline{D} \underline{F} \underline{N} \underline{W} \underline{G} \underline{N} \underline{T} “ besitzt und somit alle Aminosäuren enthält, die bei *S. cerevisiae*

⁴ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>

⁵ http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

Chs2p als notwendig für die Aktivität beschrieben wurden. Insgesamt ist aber der gesamte con2-Bereich deutlich schlechter konserviert als con1.

Interessanterweise finden sich bei keinem der Gene die für integrale Plasmamembranproteine typischen Signalpeptide, was auf einen alternativen Transportweg für Chitin Synthasen in der Zelle schließen lässt. Solche alternativen Transportwege wurden schon früh postuliert, als man herausfand, dass Chitin Synthasen häufig in speziellen Vesikeln, den sog. Chitosomen zu finden sind (Bracker *et al.*, 1976). Chitosomen, die sich sowohl in Hefe (Leal-Morales *et al.*, 1994) als auch in *N. crassa* (Sietsma *et al.*, 1996) finden, scheinen also in allen Pilzen für den Transport der Chs-Enzyme genutzt zu werden. Mittels differentieller Dichtegradientenzentrifugation konnte auch gezeigt werden, dass sich die Chitosomen von allen anderen membranösen Organellen der Zelle wie Mitochondrien, Golgi-Vesikel oder Vakuolen unterscheiden (Ziman *et al.*, 1996). Interessanterweise wurde ebenfalls nachgewiesen, dass sich β -1,3-Glucan-Synthasen nicht in den Chitosomen befinden (Leal-Morales *et al.*, 1994). Mit genetischen und immunologischen Methoden konnten in *S. cerevisiae* Sekretionswege nachgewiesen werden, die spezifisch dem Transport einzelner Chitin Synthasen dienen (Santos & Snyder, 1997; Trilla *et al.*, 1999; Ziman *et al.*, 1998).

IV.3.2.1 Beziehung zum Cytoskelett

Ein wesentlicher struktureller Aspekt von *C. graminicola* ChsC ist das Vorhandensein einer Myosin-artigen Domäne am N-Terminus, die sich über mehr als 1/3 des gesamten Proteins erstreckt. Solche Gene sind – wie erwähnt – bislang nur aus drei weiteren Pilzen bekannt, nämlich *A. nidulans*, *M. grisea* und *B. graminis* (Fujiwara *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000). Ein Hauptmerkmal der Myosin-Domäne ist der Nukleotidtriphosphat Bindebereich („GESGSGK“), der sogenannte *P-loop*. Auffallend ist allerdings in allen diesen Enzymen das Fehlen der IQ-Motive, die bei Myosinen normalerweise am Übergang von der Motor- zur Schwanzdomäne liegen und u.a. die Wechselwirkung mit anderen Proteinen (z.B. leichte Ketten) vermitteln (Übersicht zu unkonventionellen (d.h. nicht-muskulären) Myosinen z.B. bei Mermall *et al.*, 1998). Die Funktion der Myosin-Domäne ist für die *in vivo* Aktivität des Enzyms notwendig, da Konstrukte ohne diese Domäne nicht in der Lage waren, *AncsmA* Mutanten von *A. nidulans* zu komplementieren (Horiuchi *et al.*, 1999). Wahrscheinlich hat diese Domäne keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität, mag aber entscheidend für den Transport des Enzyms zum Plasmalemma sein, da auch das Aktin-Gerüst der Zelle an Transport und Exocytose sekretorischer Vesikel beteiligt ist (Torralba *et al.*, 1998). Die Autoren konnten zeigen, dass

die Hemmung der Aktinpolymerisation mit Cytochalasin A bei *A. nidulans* zu blasigen Ausstülpungen des Hyphenapex und zum Ausbleiben der Septierung führt. Außerdem kommt es zu einer reduzierten Sekretion extrazellulärer Enzyme. Damit läge in der Modulation des Aktingerüsts ein idealer Ansatzpunkt für eine zeitliche und räumliche Regulation der Chitin Synthese (siehe auch IV.3.3).

Bei Chitin Synthasen, die keine Myosin-Domäne aufweisen, könnten freie Myosine die gleiche Rolle übernehmen. Beim Hefe-Protein Chs3p ist bekannt, dass dessen Transport unter anderem von dem Myosin Myo2p abhängt, das offensichtlich auch mit Aktinfasern interagiert (Karpova *et al.*, 2000; Santos & Snyder, 1997).

Neben Aktin spielen in filamentösen Pilzen auch die Mikrotubuli und assoziierte Proteine eine Rolle beim apikalen Hyphenwachstum. Sowohl in *N. crassa* als auch in *U. maydis* ist Kinesin, ein Mikrotubuli-abhängiges Motorprotein, wichtig für die Morphologie der Hyphen (Lehmler *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1997). In *N. crassa* bewirkt die Mutation in Kinesin ein Fehlen des Spitzenkörpers. Nach dem *vesicle supply center* (VSC-) Modell von Bartnicki-Garcia und Kollegen (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995) erzeugt der Spitzenkörper als VSC einen Vesikelgradienten mit maximaler Vesikeldichte im Hyphenapex (siehe auch I.2.2). Fehlt dieses VSC, kommt es zum Zusammenbruch dieses Gradienten und damit zu einem eher gleichförmig verteilten Zuwachs an Plasmamembran und Zellwandmaterial. Dementsprechend besitzen die Hyphen der Kinesin-Mutanten einen größeren Durchmesser und weisen keinen zylindrischen, sondern einen unregelmäßig halbrunden Apex auf. Sie sind zudem stark verzweigt und haben eine geringere Wachstumsrate. Auch Mutationen in Dynein, einem weiteren Mikrotubuli-assozierten Motor, führen zu einem gekräuselten Habitus der Hyphen, einem fast nicht mehr wahrnehmbaren Spitzenkörper und einem unregelmäßig geformten Apex (Riquelme *et al.*, 2000). Insgesamt ist das genaue Zusammenspiel der einzelnen Zytoskelettkomponenten für den Transport und die Exkretion von Vesikeln jedoch noch unklar, wobei es sich abzeichnet, dass Mikrotubuli-abhängige Prozesse eher für den Ferntransport und die Lokalisation des VSC zuständig sind, die Aktin-abhängigen Prozesse dagegen für den Transport zur und die Lokalisation an der Plasmamembran verantwortlich sind.

IV.3.3 Regulation der CHS-Aktivität

IV.3.3.1 regulatorische Promotorelemente

Die Analyse der Promotorsequenz der einzelnen *Chs*-Gene ergab eine Reihe von möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, deren Bedeutung im Folgenden genauer betrachtet werden soll. Dabei soll auch der Vergleich mit den Promotoren der *Chs*-Gene aus *N. crassa* und *A. nidulans* gezogen werden, die, soweit verfügbar, mit demselben Programm analysiert wurden.

Interessanterweise fanden sich in allen drei Promotoren aus *C. graminicola* ähnliche Elemente, wobei die Häufigkeit der einzelnen Elemente z.T. stark variierte. Am häufigsten bei *ChsA* waren Nit2, StuA und STRE. Inwiefern Nit2, der Hauptregulator im Bereich des Stickstoffmetabolismus (Fu & Marzluf, 1990), eine Rolle für die Chitin Synthese spielt ist unklar. Das gleiche Element findet sich allerdings auch in großer Zahl in den zu *ChsA* homologen Genen *Chs3* aus *N. crassa* und *ChsC* aus *A. nidulans*.

Die Bindestelle für StuA, das in *A. nidulans* bei der sexuellen und asexuellen Differenzierung beteiligt ist (Dutton *et al.*, 1997), findet sich in annähernd gleicher Zahl in allen untersuchten Promotoren mit Ausnahme von *AnChsA*, bei dem dieses Element fehlt. Allerdings standen hier auch nur 363 bp für die Analyse zur Verfügung. Auch die STRE-Elemente, die auf eine Aktivierung unter verschiedenen Stressbedingungen hinweisen (Schuller *et al.*, 1994), fanden sich in fast allen Promotoren, die höchste Zahl in *ChsA* und *ChsC* aus *C. graminicola*, sowie in *AnChsD*. Das Vorhandensein dieser beiden Elemente in *Chs*-Promotoren ist nicht erstaunlich, da bei Differenzierungsvorgängen und Stressreaktionen Modulationen der Zellwand notwendig sind.

Auffällig bei *CgChsB* ist die große Zahl an Gcr1-Bindestellen. Gcr1 ist in *S. cerevisiae* wichtig für eine hohe Expression verschiedener Gene der Glykolyse, die normalerweise als konstitutiver Stoffwechselweg angesehen wird (Huie *et al.*, 1992). Das Vorkommen dieser Bindestellen im *CgChsB*-Promotor könnte also ein Hinweis auf eine konstitutive Expression sein. Dieser Hinweis bestätigt sich durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse (siehe auch IV.3.3.2). Ähnlich häufig findet sich das Gcr1-Element auch in den Promotoren der homologen Gene *NcChs1* und *AnChsB*, über deren Expression allerdings keine publizierten Daten vorliegen.

Auch die anderen Elemente finden sich in diesen Klasse III-Genen in annähernd gleicher Zahl (obwohl auch hier die untersuchten Bereiche unterschiedlich lang waren), was für eine ähnliche Funktion spricht. Umso erstaunlicher erscheint daher die Tatsache, dass die

Inaktivierung von *CgChsB* im Gegensatz zu den homologen Genen aus *N. crassa* und *A. nidulans* keinen Effekt hatte.

Die Besonderheit des *CgChsC*-Promotors liegt im Vorhandensein mehrerer AbaA-Bindestellen sowie Elementen, die bei der sexuellen Differenzierung eine Rolle spielen. AbaA ist bei *A. nidulans* an der Entwicklung von Konidiophoren beteiligt (Andrianopoulos & Timberlake, 1994) und findet sich dementsprechend in den Promotoren der Gene, die ausschließlich (*AnChsA*) oder unter anderem (*AnChsC*, *AnChsD*) während der Differenzierung von Konidiophoren exprimiert werden (Culp *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2000; Motoyama *et al.*, 1997). Das Fehlen von Sporenlagern in den $\Delta chsC$ -Mutanten von *C. graminicola* spricht für eine Rolle dieses Gens bei der asexuellen Fortpflanzung. Andererseits finden sich auch AbaA-Elemente im *CgChsA*-Promotor, so dass vermutlich eine gewisse Redundanz in diesem Bereich vorliegt, was auch durch die RT-PCR Untersuchungen unterstrichen wird, bei denen sich die Transkripte aller vier *Chs*-Gene in Sporen nachweisen ließen.

Wie bereits erwähnt, finden sich daneben im *CgChsC*-Promotor noch eine große Zahl von Bindestellen für Faktoren, die an der sexuellen Differenzierung beteiligt sind (Mat a1 aus *S. cerevisiae*, Mat1-Mc aus *S. pombe*). Da bei diesem Vorgang auch Veränderungen der Zellwandsynthese notwendig sind, erscheint der Einfluss solcher Faktoren auf Chitin Synthesen plausibel. Für *S. pombe* konnte die erhöhte Expression des *Chs1*-Gens bei der Ascosporenbildung gezeigt werden (Arellano *et al.*, 2000) und die Expression von *Chs3* aus *S. cerevisiae* wird unter dem Einfluss von *mating* Pheromon hochreguliert (Shaw *et al.*, 1991). Auch in den Promotoren der *N. crassa* und *A. nidulans* Gene finden sich einige dieser Bindestellen, allerdings wurden bislang noch keine Untersuchungen zur Rolle einzelner *Chs*-Gene bei der sexuellen Fortpflanzung dieser Organismen durchgeführt, was auch für die vorliegende Arbeit gilt.

IV.3.3.2 Regulation auf Transkript- und Proteinebene

Die Regulation der Chitin Synthesen ist ebenso wie die Funktion einzelner Gene außer bei *S. cerevisiae* nur ungenügend untersucht. Bei der Hefe scheint ein Gen (*Chs2*) transkriptionell, die beiden anderen dagegen posttranslational reguliert zu werden (Choi *et al.*, 1994a). Ein posttranslationaler Mechanismus ist auch bei der Regulation vieler *Chs*-Gene aus anderen Organismen beteiligt, auch wenn einzelne davon zumindest teilweise transkriptionell reguliert werden.

In *A. fumigatus* konnte die Transkription von sechs verschiedenen *Chs*-Genen in vegetativen Hyphen nachgewiesen werden (Mellado *et al.*, 1995), so dass hier die Regulation – wenn überhaupt – posttranslational stattfindet. Dasselbe gilt für *U. maydis*, bei dem die Expression von fünf verschiedenen Genen während des Wachstums als Hefe und des Hyphenwachstums gezeigt wurde (Gold & Kronstad, 1994; Xoconostle-Cazares *et al.*, 1996; Xoconostle-Cazares *et al.*, 1997). Dabei weisen zwei dieser Gene (*Chs3* und *Chs4*) eine erhöhte Expression im Hyphenstadium auf. Allerdings zeigen die Hyphen in den $\Delta chs3$ und $\Delta chs4$ Mutanten keine Auffälligkeit, so dass die Bedeutung der erhöhten Expression in diesen Fällen unklar bleibt (Xoconostle-Cazares *et al.*, 1996).

Interessanterweise scheint es jedoch einige Gene zu geben, die speziell oder vermehrt in reproduktiven Geweben exprimiert werden. Dazu gehört z.B. *Chs1* von *Schizosaccharomyces pombe*, das verstärkt in Ascosporen transkribiert wird (Arellano *et al.*, 2000). Die Inaktivierung dieses Gens führt zu einer hohen Zahl an Asci ohne Ascosporen und, falls diese doch vorhanden sind, ist die Ausbildung der Zellwand stark gestört. Weitere Gene dieser Gruppe sind *Chs3* und *Chs4* des Trüffels *Tuber borchii*, die beide eine erhöhte Expression während der Fruchtkörperentwicklung aufweisen. Dabei finden sich die *Chs3* Transkripte ausschließlich in den heranreifenden Sporen, *Chs4* Transkripte dagegen in den sie umgebenden vegetativen Zellen (Balestrini *et al.*, 2000).

Auch in *A. nidulans* konnte mit Hilfe einer β -Galactosidase Fusion gezeigt werden, dass *ChsA* ausschließlich in Konidiophoren und Konidien exprimiert wird, was mit dem Phänotyp der $\Delta chsA$ Mutanten und der daraus abgeleiteten Rolle dieses Gens bei der Konidienbildung sowie mit dem Vorkommen der *abaA* Elemente im Promotor übereinstimmt. Das Gen *ChsC* dagegen, das ebenfalls mit der Konidienbildung in Verbindung gebracht wird, ist auch während des vegetativen Wachstums exprimiert (Fujiwara *et al.*, 2000).

Bei *C. graminicola* wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Ansätze verfolgt. Zum einen sollten die Transkripte mittels RT-PCR in verschiedenen Stadien nachgewiesen werden, zum anderen sollte die Expression der Gene über eine Fusion des GFP-Reportergens an den jeweiligen Promotor mikroskopisch verfolgt werden.

In der RT-PCR zeigte sich, dass alle vier identifizierten Gene in allen untersuchten Stadien exprimiert werden. Die Transkripte lassen sich in vegetativen Hyphen, in Appressorien und in infizierten Pflanzen nachweisen. Die Stärke der Banden für die einzelnen Gene ist dabei in etwa vergleichbar, auch wenn die Zahl der Zyklen bei der PCR variiert wird. Dies deutet darauf hin, dass alle Gene ähnlich stark exprimiert werden. Aufgrund des exponentiellen Reaktionsverlaufs bei einer PCR lässt sich darüber aber kein abschließendes Urteil fällen.

Im Gegensatz zur RT-PCR, die eine hohe Sensitivität aufweist, bietet die Fusion an GFP eine bessere zeitliche und lokale Auflösung der einzelnen Strukturen. Bei der RNA-Präparation ist es z.B. nicht möglich, Appressorien von Sporen zu trennen, was mikroskopisch kein Problem darstellt. Außerdem erhält man in einem Fall eine Aussage über das Vorhandensein von Transkripten, im anderen Fall von Proteinen, was nicht notwendigerweise miteinander korreliert sein muss (siehe unten).

Die Fusion mit GFP und anschließende Transformation in den Pilz war für *CgChsA* und *CgChsB* erfolgreich. Hier zeigten sich nur geringfügige Unterschiede im Vergleich zu einem konstitutiven GAPDH-Promotor, wobei besonders bei *ChsA* die Fluoreszenz nicht so stark ausgeprägt war. Allerdings konnte auch hier die Fluoreszenz in allen Stadien gezeigt werden, so dass bei *C. graminicola* eine Regulation sehr wahrscheinlich hauptsächlich auf posttranslationaler Ebene stattfindet oder in Stadien des Lebenszyklus (z.B. während der sexuellen Entwicklung), die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Ein interessanter Aspekt, der bei Chitin Synthesen häufiger beobachtet wird, ist eine mangelhafte Korrelation zwischen Transkriptmenge eines bestimmten Isozyms, der messbarer Enzymaktivität und dem Chitin-Gehalt der Zellwand. Besonders auffällig ist diese Tatsache bei verschiedenen Chitin Synthase Mutanten, bei denen trotz des Ausfalls eines Isozyms und eines drastischen Phänotyps keine oder nur minimale Änderungen im Chitin-Gehalt oder der Chitin Synthase Aktivität festzustellen sind (Borgia *et al.*, 1996).

Bei *A. fumigatus* z.B. ist in den $\Delta chsD$ Mutanten der Chitin-Gehalt um 20 % reduziert, die messbare Aktivität und die Morphologie der Mutanten aber vergleichbar zum Wildtyp (Mellado *et al.*, 1996b). Umgekehrt weisen die $\Delta chsG$ Mutanten einen stark gestörten Phänotyp auf und die CHS-Aktivität ist auf ca. 1/3 des Wildtyps reduziert, der Chitin-Gehalt ist aber nicht beeinträchtigt (Mellado *et al.*, 1996a). Ersteres ließe sich dadurch erklären, dass diese spezielle Chitin Synthase (*ChsD*) nicht im Aktivitätstest erfasst wird. Aus *S. cerevisiae* ist z.B. sehr gut bekannt, dass die einzelnen Isozyme unterschiedliche Anforderungen bezüglich Cofaktoren oder proteolytischer Aktivierung besitzen (Choi & Cabib, 1994). Der zweite Fall ist schwieriger zu erklären. Hier könnte es sein, dass bestimmte Chitin-Fractionen in der Zellwand speziell für die Quervernetzung untereinander und mit anderen Zellwandkomponenten notwendig sind, insgesamt aber wenig zur Gesamtmenge an Chitin beitragen. Ein Ausfall des Enzyms, das diese Fraktion synthetisiert, würde dann den für $\Delta chsG$ beschriebenen Phänotyp bewirken.

Im Fall von *C. graminicola ChsC* resultiert die Inaktivierung in einer moderaten Reduktion des Chitin-Gehalts um ca. 30 %. Wie oben erwähnt (siehe IV.3.1.2) scheint aber neben dieser

Reduktion auch eine mangelhafte Quervernetzung mit anderen Zellwandkomponenten, die sich in der Verringerung des Mannose-Gehalts äußert, für den Phänotyp dieser Mutanten verantwortlich zu sein.

Diese Daten deuten darauf hin, dass bei der Chitin Synthese eine Reihe verschiedener regulatorischer Mechanismen ineinander greifen, weshalb sich das Ergebnis eines Eingriffs von außen (z.B. einer *knock-out* Mutagenese) nicht vorhersagen lässt. Klar ist, dass der Organismus durch diese Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen in der Lage ist, sehr variabel auf die verschiedensten Änderungen in seiner Umwelt zu reagieren (siehe auch IV.3.3.4).

IV.3.3.3 Signalwege bei der Regulation

Da Chitin Synthese sowohl unter Einfluss von Stress (siehe IV.3.3.4), als auch während normaler Entwicklungsprozesse wie Keimung, Hyphenverzweigung und Differenzierung von Fortpflanzungs- und Infektionsstrukturen reguliert werden muss, ist es klar, dass es eine Reihe spezifischer und allgemeiner Signalwege geben muss, die einzeln oder auch in Kombination zu einer entsprechenden zellulären Antwort führen (zur Signaltransduktion während der Differenzierung von Infektionsstrukturen siehe Deising *et al.*, 2000).

Aus Hefe sind insgesamt fünf MAP (*mitogen activated protein*) Kinase Wege bekannt, die Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung haben und die unter unterschiedlichen äußeren Einflüssen bzw. zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien aktiviert werden (Gustin *et al.*, 1998). Interessant ist dabei vor allem die sog. *cell integrity* Kaskade, die beginnend mit der Protein Kinase C (Pkc1p) über drei weitere Kinasen zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt (Heinisch *et al.*, 1999). Dieser Weg wird bei Stress aktiviert (z.B. Hitze, hypotones Medium), ist aber auch Zellzyklus- und Pheromon-abhängig. Ein Ziel für die Regulation durch diesen Signalweg sind die Glucan Synthase Untereinheiten *Fks1* und *Fks2*, die α -Mannosyltransferase *Mnn1* und die Chitin Synthase *Chs3* (Igual *et al.*, 1996). Dementsprechend zeigen Mutanten in einer der Signal-Komponenten als ein Hauptmerkmal einen osmotisch stabilisierbaren Wachstumsdefekt, besonders bei erhöhter Temperatur. Interessanterweise ist das G-Protein Rho1p sowohl ein Aktivator von Pkc1p als auch ein direkter Regulator des Glucan Synthase Komplexes in der Plasmamembran (Cabib *et al.*, 1998). Welche Faktoren genau die Aktivierung des PKC-Weges bewirken, ist aber noch nicht restlos geklärt. Zwei solcher membranständiger Stresssensoren könnten die Proteine Mid2p und Wsc1p sein, die verschiedene Rollen bei der Wahrnehmung von Zellwandstress einnehmen (Heinisch *et al.*, 1999 und Referenzen darin).

Natürlich spielen auch G-Proteine als Übermittler der Rezeptoraktivierung auf die Kinasekaskaden eine Rolle bei der Signaltransduktion. Neben dem bereits erwähnten Rho1p, welches z.B. auch bei *A. fumigatus* Teil des Glucan Synthase Komplexes ist (Beauvais *et al.*, 2001), konnte bei *A. nidulans* ein weiteres trimeres G-Protein charakterisiert werden, das offensichtlich einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellwand hat (Coca *et al.*, 2000). Die Inaktivierung der β -Untereinheit führte hier zu einer Verdickung der Zellwände und einem ca. vierfach höheren Chitin-Gehalt. Darüber hinaus sind G-Proteine natürlich auch bei einer Reihe anderer wichtiger Prozesse wie *mating* und Pathogenese beteiligt (Bölker, 1998), die ebenfalls eine Regulation der Zellwandsynthese erfordern.

Ein weiterer zu den Kinasekaskaden parallel verlaufender, z.T. überlappender Signalweg verläuft über Ca^{2+} /Calmodulin (CaM) und die CaM-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (Garrett-Engele *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998). Calcineurin Mutanten von *S. cerevisiae* zeigen unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Phänotyp, sterben aber unter Einfluss hoher extrazellulärer Ionenkonzentrationen oder Pheromon ab (Garrett-Engele *et al.*, 1995). Doppelmutanten in Calcineurin und *pkc1* oder *fksl* sind letal, können aber durch Überexpression von abwärts gelegenen Signalkomponenten des *cell integrity* Wegs (z.B. der MAP Kinase Kinase Mkk1p) komplementiert werden (Zhao *et al.*, 1998). Die Bedeutung von Ca^{2+} wird auch dadurch unterstrichen, dass Hefen bei einem hypoosmotischen Schock mit einem schnellen, transienten Calcium Puls reagieren (Batiza *et al.*, 1996).

Neben dem Einfluss auf die Genexpression könnte Ca^{2+} /CaM auch noch auf andere Weise die Chitin Synthese regulieren. Es gibt Hinweise auf eine direkte Aktivierung der Chitin Synthese in Hefe durch Ca^{2+} (Fernandez *et al.*, 1982) bzw. auf einen aktivierenden Einfluss von Calmodulin auf die Chitin Synthase Aktivität in *N. crassa* (Suresh & Subramanyam, 1997). Da hierbei auch eine CaM-abhängige Phosphorylierung microsomalere Proteine gezeigt wurde, scheint es sich um einen eher indirekten Einfluss auf die CHS-Aktivität zu handeln.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation durch CaM besteht in der Interaktion mit dem Cytoskelett, d.h. in der Regulation von Transport und Lokalisierung CHS-haltiger Vesikel. Hierzu konnte in Hefe gezeigt werden, dass CaM-Mutationen zu einer Delokalisierung des Aktingerüsts führen. Diese Mutation führt zu einem Verlust der Interaktion von CaM mit dem Klasse V Myosin Myo2p, das seinerseits mit Aktin interagiert (Sekiya-Kawasaki *et al.*, 1998). Da sowohl Myo2p als auch Aktin für die korrekte Lokalisierung von Chs3p notwendig sind (Karpova *et al.*, 2000; Santos & Snyder, 1997), scheinen diese Komponenten ein geeigneter Ansatzpunkt für eine Regulation der Chitin Synthese zu sein.

Allerdings ist es eher fraglich, ob dieser Mechanismus auch für die *Csm*-Gene der filamentösen Pilze gilt. Die Interaktion von CaM und Myosin erfolgt nämlich über die IQ-Motive, die in diesen Genen –wie bereits erwähnt– nicht vorhanden sind. Dennoch spielt das CaM-Myosin System auch in filamentösen Pilzen eine Rolle. *MyoA* ist ein essentielles Klasse I Myosin in *A. nidulans* (McGoldrick *et al.*, 1995). Es hat Bedeutung für die Sekretion, Aufrechterhaltung der Zellpolarisation und die Endocytose. Osheroov und Mitarbeiter konnten nun zeigen, dass das IQ-Motiv von *MyoA* mit CaM interagiert und dass das Fehlen dieses Motivs einen drastischen Einfluss auf Morphologie und Entwicklung von *A. nidulans* hat (Osheroov *et al.*, 1998). Entsprechende Mutanten zeigen eine verzögerte Keimung mit multiplen Keimschläuchen, ein ungewöhnliches Verzweigungs- und Septierungsmuster sowie geschwollene Hyphenspitzen mit verdickten Zellwänden. Dieser Phänotyp weist auf deutliche Störungen in der Zellwandsynthese hin, allerdings wird in dieser Arbeit keine direkte Korrelation zur Chitin Synthese aufgezeigt.

Insgesamt muss man sagen, dass im Bereich der Regulation der Chitin Synthese in filamentösen Pilzen noch zahlreiche Fragen offen sind und obwohl es einige Untersuchungen zu Signalwegen gibt und deren Einfluss auf die Beschaffenheit der Zellwand eindeutig ist, wurde bislang keine direkte Verknüpfung zur Chitin Synthese gezogen.

IV.3.3.4 Reaktion der Chitin Synthese auf Stress

Die Chitin Synthese reagiert auf eine Reihe äußerer Stressfaktoren, insbesondere solche, die einen direkten Einfluss auf die Zellwand besitzen. Dazu zählen z.B. Einflüsse auf die Glucan Synthese, Chitin-bindende Substanzen wie Calcofluor White oder osmotischer Stress (Roncero & Duran, 1985, sowie Referenzen unten). Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass viele dieser Gene Stress-responsive Elemente in ihren Promotoren besitzen (siehe IV.3.3.1).

Die Reaktionen auf Defekte in der Glucan Synthese lassen sich am besten an Mutanten untersuchen und auch hier stammen die meisten Daten von der Bäckerhefe. Eine Mutante im konstitutiv exprimierten Glucan Synthase Gen *fks1* zeigt einen sechsfach höheren Chitin-Gehalt als der Kontrollstamm, der hauptsächlich auf die Aktivität von Chs3 zurückzuführen ist, da Doppelmutanten in *fks1* und *chs3* diese Erhöhung nicht zeigen (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000). Allerdings geht diese Aktivitätserhöhung nicht mit einer höheren Menge an Chs3p einher, sondern scheint vielmehr auf einer veränderten Lokalisierung des Enzyms zu beruhen, bei der eventuell die Proteine Chs4p und Chs7p eine Rolle spielen (siehe auch I.3.1).

Eine andere Mutante mit einem inaktivierten *gas1/ggp1* Gen, das für eine β -1,3-Glucosyltransferase codiert, die wichtig für die korrekte Vernetzung von Glucanen und Mannoproteinen in die Zellwand ist, zeigt ebenfalls deutlich erhöhte Chitin-Werte (Popolo *et al.*, 1997; Valdivieso *et al.*, 2000). Auch in diesem Fall geht die Erhöhung auf *Chs3* zurück, ohne dass sich nennenswerte Unterschiede im Transkript- oder Enzym-Gehalt von *Chs3* nachweisen lassen, was stark auf eine posttranslationale Regulation hinweist.

Eine mögliche Hypothese zur Regulation von Chitin Synthasen durch Membranstress stammt von Gooday & Schofield (1995, und darin enthaltene Referenzen). Sie zeigen, dass Chitin Synthese immer dann aktiviert ist, wenn die Plasmamembran physikalisch unter Stress gerät. Dies kann unter normalen physiologischen Bedingungen am Hyphenapex oder an den Verzweigungsstellen der Fall sein. An diesen Stellen befindet sich die Zellwand aufgrund fehlender Quervernetzung bzw. durch die kontrollierte Einwirkung hydrolytischer Enzyme in einem plastischen Zustand und kann somit dem Turgor im Zellinnern nur bedingt Widerstand entgegensetzen. Dies führt zu einer Ausdehnung der Zellwand und dementsprechend auch zu einer Streckung der Plasmamembran (siehe auch Einleitung).

Der Stress kann aber auch durch verschiedene Behandlungen induziert werden. Dazu gehören vor allem hypoosmotischer Stress, der zu einer Erhöhung des Turgors führt und die Behandlung mit Chemikalien, die zu einer Schwächung der Zellwand führen, wie z.B. Calcofluor White oder Kongorot. Diese Stoffe lagern sich zwischen die Chitin-Fibrillen ein und vermindern so die Kristallisation, was wiederum zu einer höheren Plastizität führt. Andere Stoffe, wie z.B. Ergosterolbiosynthesehemmer beeinflussen direkt die Plasmamembran, indem sie deren Fluidität herabsetzen.

Über die Frage, über welche Mechanismen dieser Membranstress letztendlich zu einer Enzymaktivierung führt, kann nur spekuliert werden. Eventuell sind dabei Stress-aktivierte Ionenkanäle beteiligt, möglicherweise reagieren die Chitin Synthasen aber als membranständige Enzyme auch direkt auf veränderte Zustände der Plasmamembran.

IV.3.4 Chitin Synthese und Pathogenität

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von Chitin als stabilisierende Zellwandkomponente für Infektionsstrukturen zu untersuchen. Hintergrund dafür ist die Tatsache, dass einige Pilze – darunter auch *C. graminicola* – melanisierte Appressorien bilden, in denen durch Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen hohe Turgordrücke von bis zu 8 MPa erzeugt werden (Bechinger *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 1991; Bastmeyer *et al.*, 2002). Diese Drücke werden ausgenutzt, um die unter dem Appressorium liegende

Epidermiszellwand des Wirts zu penetrieren. Für das Appressorium selbst heißt das, dass seine eigene Zellwand stabil genug sein muss, diesem Druck standzuhalten. Da Chitin ein wesentlicher struktureller Bestandteil der Zellwand von *C. graminicola* ist, lag es nahe, dessen Beteiligung an diesem Prozess zu untersuchen.

Als Ergebnis lässt sich feststellen, dass Chitin in der Tat für die Stabilität der Zellwand (mit-)verantwortlich ist. Sowohl unter Einfluss des Inhibitors Nikkomycin Z als auch nach Inaktivierung des Gens *CgChsC* konnten deutliche morphologische Veränderungen festgestellt werden, die auf eine Schwächung der Zellwand schließen lassen. Allerdings beschränken sich diese Veränderungen nicht auf die Infektionsstrukturen, sondern treten auch während des normalen vegetativen Wachstums auf. Das geht soweit, dass die $\Delta chsC$ Mutanten nur noch auf osmotisch stabilisierten Nährmedien wachsen können. Umgekehrt wurden auch zwei weitere *Chs*-Gene isoliert, die zwar u.a. während der Appressoriendifferenzierung exprimiert werden, deren Inaktivierung aber keinen Einfluss auf Morphologie oder Virulenz hatte.

Insgesamt lässt sich sagen, dass Chitin ein essentieller Zellwandbestandteil von *C. graminicola* ist und dass dies auch für die Infektionsstrukturen gilt. Es konnte aber kein Hinweis darauf gefunden werden, dass unter den besonderen Anforderungen, die während des Penetrationsprozesses an die Zellwandstabilität gestellt werden, die Chitin Synthese oder einzelne Chitin Synthasen in besonderem Maße beansprucht werden.

V Zusammenfassung - Summary

V.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Zellwandkomponente Chitin für die Stabilität von Hyphen und Infektionsstrukturen des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* (CESATI) WILSON untersucht.

Im ersten Teil der Untersuchungen konnte mit Hilfe des kompetitiven Chitin Synthase Inhibitors Nikkomycin Z gezeigt werden, dass eine Hemmung der Chitin Synthase zu starken Deformationen der pilzlichen Zellen führt. Vegetative Hyphen weisen nach Inhibitorbehandlung zahlreiche laterale und apikale blasige Ausstülpungen auf. Die Zahl und Ausprägung dieser Ausstülpungen steigt mit zunehmender Inhibitorkonzentration an. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an *in vitro* induzierten Infektionsstrukturen gemacht. Keimschläuche und/oder Appressorien dehnen sich blasenförmig aus, bei hohen Konzentrationen unterbleibt die Melanisierung der Appressorien und es kommt zum Kollabieren der Strukturen. Die Schädigung der Strukturen ist bei höheren Konzentrationen so stark, dass keine erfolgreiche Penetration des Wirtsgewebes mehr möglich ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Beteiligung einzelner Chitin Synthase Gene untersucht. Mittels degenerierter Primer wurden die Fragmente von vier verschiedenen *Chs*-Genen amplifiziert (*ChsA-D*), wovon im Folgenden drei Gene komplett isoliert und sequenziert wurden (*ChsA-C*). Diese zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu den Chitin Synthasen anderer filamentöser Pilze. Interessant ist vor allem die Zugehörigkeit von *ChsC* zum sog. Csm-Typ, d.h. das Vorhandensein einer Myosin-artigen Domäne am N-Terminus des Proteins.

Ergebnisse aus RT-PCR Untersuchungen und aus Fusionen einzelner Promotoren an das GFP-Reportergen weisen darauf hin, dass die *Chs*-Gene von *C. graminicola* nicht auf Ebene der Transkription reguliert werden.

Um die Funktion einzelner Gene beurteilen zu können, wurden Vektoren konstruiert, die nach Transformation in den Pilz und nachfolgender homologer Rekombination zu einer Inaktivierung des Gens führten. Isolate mit inaktiviertem *ChsA*, *ChsB* und *ChsC* wurden morphologisch und hinsichtlich ihrer Virulenz charakterisiert.

Die $\Delta chsA$ - und $\Delta chsB$ -Mutanten wiesen dabei keinen Unterschied zum Wt-Isolat auf. *ChsC* hingegen erwies sich als ein essentielles Gen. Mutanten in diesem Gen sind nicht mehr

in der Lage, auf Standard-Nährmedien zu wachsen. Nach osmotischer Stabilisierung des Mediums entsteht ein Mycel mit ähnlicher Morphologie wie nach einer Nikkomycin Z Behandlung, nur dass die Merkmale wie Blasenbildung und Kollabieren in nicht-stabilisiertem Medium noch stärker ausgeprägt sind. Da auch die Ausbildung von Acervuli mit sichelförmigen Konidien in diesen Mutanten unterbleibt, erwies sich die Untersuchung von Infektionsstrukturen als schwierig. Daher wurde die Tatsache ausgenutzt, dass auch vegetative Hyphen bei Kontakt zu einer festen Unterlage in der Lage sind, sog. Hyphopodien zu bilden, die morphologisch und funktionell zu Appressorien analog sind. Trotzdem war auch von diesen Hyphopodien aus keine erfolgreiche Besiedlung von Wirtsgewebe möglich.

Insgesamt ist also Chitin ein essentieller Faktor für die Stabilität der Zellwand von *C. graminicola*, sowohl während des vegetativen als auch während des invasiven Wachstums. Insbesondere das Gen *ChsC* spielt dabei eine entscheidende Rolle. Der Schwerpunkt folgender Arbeiten sollte nun auf der Untersuchung der Regulation liegen unter besonderer Berücksichtigung des Cytoskeletts und der Myosin-Domäne von *ChsC*. Auch die Rolle von *ChsD* und die Erzeugung von Doppelmutanten in nicht-essentiellen Genen wären weitere zu verfolgende Fragestellungen.

V.2 Summary

In this study the role of chitin, a major cell wall component of higher fungi, for the stability of hyphae and infection structures of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* (CESATI) WILSON was examined.

It was shown in the first part of the investigations that the application of the competitive chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z led to a deformation of the fungal cells. After inhibitor treatment vegetative hyphae showed balloon-like structures along their lateral and apical walls. The severity of damage increased with higher inhibitor concentrations. Similar observations were made with infection structures induced on artificial surfaces. Germ tubes and/or appressoria increased dramatically in size and with higher concentrations melanization of appressoria did not take place and the structures collapsed. No penetration of host tissue and development of disease symptoms could be observed after Nikkomycin Z treatment.

The second part of this study was dedicated to investigate the specific role of single chitin synthase genes. Degenerate primers were used to amplify fragments of four different *Chs* genes (*ChsA-D*) and three of them were isolated and sequenced completely (*ChsA-C*). These genes show a high degree of homology to chitin synthases from several filamentous fungi.

Most interesting is the fact that ChsC belongs to the Csm-type of chitin synthases which exhibit a myosin-like domain at the N-terminal part of the protein.

Results from RT-PCR studies and from fusions of promoters to the GFP reporter gene indicate that the *Chs* genes from *C. graminicola* are not regulated on the transcriptional level.

To investigate in more detail the function of single genes *C. graminicola* was transformed with plasmids that led to the inactivation of a specific gene after homologous recombination. Mutants with inactivated *ChsA*, *ChsB* and *ChsC* gene were generated and characterized regarding their morphology and virulence.

Mutants in *ChsA* and *ChsB* showed no difference in their phenotype compared to the wildtype. In contrary the *ChsC* gene turned out to be essential. Mutants in that gene were not able to grow on standard growth media. Osmotic stabilization of the media led to a mycelium with a phenotype similar to that observed after Nikkomycin Z treatment, with balloon-like hyphae and collapsing of cells. As these mutants did not produce any acervuli with falcate conidia, vegetative hyphae that develop so-called hyphopodia -which are morphologically and functionally equivalent to appressoria- in close contact to a hard surface allowed the examination of infection structures. The hyphopodia developed by $\Delta chsC$ mutants did neither penetrate the host cell wall nor spread within the host tissue.

The final conclusion is that chitin is an essential factor for the stability of the *C. graminicola* cell wall and that *ChsC* is the most important chitin-synthesizing gene during vegetative as well as pathogenic growth. The main subject of future studies should be the investigation of the regulation of chitin synthase genes with special emphasis on the role of the cytoskeleton and the myosin-like domain of ChsC. Furthermore, the role of *ChsD* and the generation of double mutants in non-essential genes could be worth to be investigated.

VI Literatur

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Anderson, D. W. & Nicholson, R. L. (1996).** Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **88**, 996-1002.
- Andrianopoulos, A. & Timberlake, W. E. (1994).** The *Aspergillus nidulans* abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**, 2503-15.
- Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Hajibagheri, M. A. N., Durán, A. & Valdivieso, M. H. (2000).** Proper ascospore maturation requires the *chsI*⁺ chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **35**, 79-89.
- Aufauvre-Brown, A., Mellado, E., Gow, N. A. R. & Holden, D. W. (1997).** *Aspergillus fumigatus chsE*: A gene related to *CHS3* of *Saccharomyces cerevisiae* and important for hyphal growth and conidiophore development but not pathogenicity. *Fungal Genet Biol* **21**, 141-152.
- Balestrini, R., Mainieri, D., Soragni, E., Garnero, L., Rollino, S., Viotti, A., Ottonello, S. & Bonfante, P. (2000).** Differential Expression of Chitin Synthase III and IV mRNAs in Ascomata of *Tuber borchii* Vittad. *Fungal Genet Biol* **31**, 219-32.
- Bartnicki-Garcia, S. (1999).** Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genet Biol* **27**, 119-27.
- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D. D. & Gierz, G. (1995).** Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Can J Bot* **73**, S372-S378.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F. & Gierz, G. (1989).** Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* **153**, 46-57.
- Bastmeyer, M., Deising, H. B. & Bechinger, C. (2002).** Force exertion in fungal infection. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, in press.
- Batiza, A. F., Schulz, T. & Masson, P. H. (1996).** Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J Biol Chem* **271**, 23357-62.
- Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R. & Latge, J. P. (2001).** Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* **183**, 2273-9.
- Bechinger, C., Giebel, K. F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H. B. & Bastmeyer, M. (1999).** Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-9.

- Bergstrom, G. C. & Nicholson, R. L. (1999).** The biology of corn anthracnose. *Plant Disease* **83**, 596-608.
- Bölker, M. (1998).** Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol* **25**, 143-56.
- Borgia, P. T. (1992).** Roles of the *orlA*, *tsE*, and *bimG* genes of *Aspergillus nidulans* in chitin synthesis. *J Bacteriol* **174**, 384-9.
- Borgia, P. T. & Dodge, C. L. (1992).** Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell wall chitin or glucan. *J Bacteriol* **174**, 377-83.
- Borgia, P. T., Iartchouk, N., Riggle, P. J., Winter, K. R., Koltin, Y. & Bulawa, C. E. (1996).** The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet Biol* **20**, 193-203.
- Bowen, A. R., Chen-Wu, J. L., Momany, M., Young, R., Szaniszló, P. J. & Robbins, P. W. (1992).** Classification of fungal chitin synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 519-23.
- Bracker, C. E., Ruiz-Herrera, J. & Bartnicki-Garcia, S. (1976).** Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4570-4.
- Brown, T. (1999).** Southern Blotting. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2.9.1-2.9.15. Edited by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl. New York: John Wiley & Sons.
- Bulawa, C. E. (1992).** *CSD2*, *CSD3*, and *CSD4*, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *CSD2* gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* **12**, 1764-76.
- Bulawa, C. E. (1993).** Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol* **47**, 505-34.
- Cabib, E., Drgonova, J. & Drgon, T. (1998).** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **67**, 307-33.
- Cabib, E., Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B. & Choi, W.-J. (1996).** Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In *The Mycota III. Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 243-267. Edited by R. Brambl & G. A. Marzluf. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Carlile, M. J. & Watkinson, S. C. (1995).** *The Fungi*. London, Boston, San Diego: Academic Press.
- Chavez-Ontiveros, J., Martinez-Espinoza, A. D. & Ruiz-Herrera, J. (2000).** Double chitin synthetase mutants from the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytologist* **146**, 335-341.

-
- Choi, W. J. & Cabib, E. (1994).** The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. *Anal Biochem* **219**, 368-72.
- Choi, W. J., Santos, B., Duran, A. & Cabib, E. (1994a).** Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Mol Cell Biol* **14**, 7685-94.
- Choi, W. J., Sburlati, A. & Cabib, E. (1994b).** Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the *CAL1* and the *CAL3* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4727-30.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Chuang, J. S. & Schekman, R. W. (1996).** Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* **135**, 597-610.
- Chung, C. T. & Miller, R. H. (1993).** Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol* **218**, 621-627.
- Clark, J. M. (1988).** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**, 9677-86.
- Coca, M. A., Damsz, B., Yun, D. J., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. & Narasimhan, M. L. (2000).** Heterotrimeric G-proteins of a filamentous fungus regulate cell wall composition and susceptibility to a plant PR-5 protein. *Plant J* **22**, 61-9.
- Collinge, A. J. & Trinci, A. P. (1974).** Hyphal tips of wild-type and spreading colonial mutants of *Neurospora crassa*. *Arch Microbiol* **99**, 353-68.
- Cos, T., Ford, R. A., Trilla, J. A., Duran, A., Cabib, E. & Roncero, C. (1998).** Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* **256**, 419-426.
- Culp, D. W., Dodge, C. L., Miao, Y., Li, L., Sag-Ozkal, D. & Borgia, P. T. (2000).** The *chsA* gene from *Aspergillus nidulans* is necessary for maximal conidiation. *FEMS Microbiol Lett* **182**, 349-53.
- de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnoff, N. & Talbot, N. J. (1997).** Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244-245.
- Debono, M. & Gordee, R. S. (1994).** Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol* **48**, 471-97.
- Deising, H. B., Werner, S. & Wernitz, M. (2000).** The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* **2**, 1631-1641.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. & Pringle, J. R. (1997).** A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **139**, 75-93.
- Din, A. B., Specht, C. A., Robbins, P. W. & Yarden, O. (1996).** *chs-4*, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* **250**, 214-22.

- Din, A. B. & Yarden, O. (1994).** The *Neurospora crassa chs-2* gene encodes a non-essential chitin synthase. *Microbiology* **140**, 2189-2197.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R. & Burg, G. (1997).** Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and bacteria. *BioTechniques* **22**, 88-90.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. (1991).** 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**, 4008.
- Dumas, B., Centis, S., Sarrazin, N. & Esquerre-Tugaye, M. T. (1999).** Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1769-71.
- Dutton, J. R., Johns, S. & Miller, B. L. (1997).** StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo J* **16**, 5710-21.
- Epstein, L., Lusnak, K. & Kaur, S. (1998).** Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* **23**, 189-203.
- Fernandez, M. P., Correa, J. U. & Cabib, E. (1982).** Activation of chitin synthetase in permeabilized cells of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking proteinase B. *J Bacteriol* **152**, 1255-64.
- Ford, R. A., Shaw, J. A. & Cabib, E. (1996).** Yeast chitin synthases 1 and 2 consist of a non-homologous and dispensable N-terminal region and of a homologous moiety essential for function. *Mol Gen Genet* **252**, 420-8.
- Fu, Y. H. & Marzluf, G. A. (1990).** *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5331-5.
- Fujiwara, M., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (1997).** A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 75-8.
- Fujiwara, M., Ichinomiya, M., Motoyama, T., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (2000).** Evidence that the *Aspergillus nidulans* class I and class II chitin synthase genes, *chsC* and *chsA*, share critical roles in hyphal wall integrity and conidiophore development. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 359-66.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A. & Roncero, C. (2000).** Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **478**, 84-8.

- Garrett-Engle, P., Moilanen, B. & Cyert, M. S. (1995).** Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol Cell Biol* **15**, 4103-14.
- Gaughran, J. P., Lai, M. H., Kirsch, D. R. & Silverman, S. J. (1994).** Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* **176**, 5857-60.
- Gold, S. E. & Kronstad, J. W. (1994).** Disruption of two genes for chitin synthase in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **11**, 897-902.
- Gooday, G. W. & Schofield, D. A. (1995).** Regulation of chitin synthesis during growth of fungal hyphae: The possible participation of membrane stress. *Can J Bot* **73**, S114-S121.
- Goutte, C. & Johnson, A. D. (1994).** Recognition of a DNA operator by a dimer composed of two different homeodomain proteins. *Embo J* **13**, 1434-42.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. & Davenport, K. (1998).** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1264-300.
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Gottfert, M. & Mendgen, K. (1997).** A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 438-45.
- Heath, I. B. (1994).** The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements, and mitosis. In *Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 43-65. Edited by W. J.G.H. & F. Meinhardt. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Heath, I. B. (1995).** Integration and regulation of hyphal tip growth. *Can J Bot* **73**, S131-S139.
- Hector, R. F. & Braun, P. C. (1986).** Synergistic action of nikkomycins X and Z with papulacandin B on whole cells and regenerating protoplasts of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **29**, 389-94.
- Hector, R. F. & Schaller, K. (1992).** Positive interaction of nikkomycins and azoles against *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1284-9.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P. & Jacoby, J. J. (1999).** The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **32**, 671-80.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A. & Takagi, M. (1999).** Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **181**, 3721-9.
- Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H. & Money, N. P. (1991).** Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11281-4.

- Huie, M. A., Scott, E. W., Drazinic, C. M., Lopez, M. C., Hornstra, I. K., Yang, T. P. & Baker, H. V. (1992).** Characterization of the DNA-binding activity of GCR1: in vivo evidence for two GCR1-binding sites in the upstream activating sequence of TPI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 2690-700.
- Igual, J. C., Johnson, A. L. & Johnston, L. H. (1996).** Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *Embo J* **15**, 5001-13.
- Karpova, T. S., Reck-Peterson, S. L., Elkind, N. B., Mooseker, M. S., Novick, P. J. & Cooper, J. A. (2000).** Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**, 1727-37.
- Katz, D. & Rosenberger, R. F. (1970).** A mutation in *Aspergillus nidulans* producing hyphal walls which lack chitin. *Biochim Biophys Acta* **208**, 452-60.
- Kjaerulff, S., Dooijes, D., Clevers, H. & Nielsen, O. (1997).** Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S.pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *Embo J* **16**, 4021-33.
- Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W. & Cabib, E. (1995).** Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-3)-glucan. *J Biol Chem* **270**, 1170-78.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. & Cabib, E. (1997).** Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**, 17762-75.
- Krainer, E., Becker, J. M. & Naider, F. (1991).** Synthesis and biological evaluation of dipeptidyl and tripeptidyl polyoxin and nikkomycin analogues as anticandidal prodrugs. *J Med Chem* **34**, 174-80.
- Kubo, Y. & Furusawa, I. (1991).** Melanin biosynthesis: prerequisite for successful Invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, pp. 205-217. Edited by G. T. Cole & H. C. Hoch. New York: Plenum Press.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I. & Yamamoto, M. (1982).** Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* **72**, 1198-1200.
- Leach, J., Lang, B. R. & Yoder, O. C. (1982).** Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *J Gen Microbiol* **128**, 1719-1729.
- Leal-Morales, C. A., Bracker, C. E. & Bartnicki-Garcia, S. (1994).** Subcellular localization, abundance and stability of chitin synthetase 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**, 2207-2216.

- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R. & Bolker, M. (1997).** Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Embo J* **16**, 3464-73.
- Leite, B. & Nicholson, R. L. (1992).** Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp Mycol* **16**, 76-86.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, g., Bronson, C., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G. (1994).** Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12649-12653.
- Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B. A. & Sharon, A. (1998).** Use of the green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycol Res* **102**, 491-496.
- McCarthy, P. J., Troke, P. F. & Gull, K. (1985).** Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **131**, 775-80.
- McGoldrick, C. A., Gruver, C. & May, G. S. (1995).** *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J Cell Biol* **128**, 577-87.
- Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Gow, N. A. & Holden, D. W. (1996a).** The *Aspergillus fumigatus chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol* **20**, 667-79.
- Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Specht, C. A., Robbins, P. W. & Holden, D. W. (1995).** A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Gen Genet* **246**, 353-9.
- Mellado, E., Specht, C. A., Robbins, P. W. & Holden, D. W. (1996b).** Cloning and characterization of *chsD*, a chitin synthase-like gene of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **143**, 69-76.
- Mercure, E. W., Kunoh, H. & Nicholson, R. L. (1994a).** Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiol Mol Plant Pathol* **45**, 407-420.
- Mercure, E. W., Leite, B. & Nicholson, R. L. (1994b).** Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiol Mol Plant Pathol* **45**, 421-440.
- Mermall, V., Post, P. L. & Mooseker, M. S. (1998).** Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-33.
- Merz, R. A., Horsch, M., Nyhlen, L. E. & Rast, D. M. (1999).** Biochemistry of chitin synthase. *Exs* **87**, 9-37.
- Milewski, S., Chmara, H. & Borowski, E. (1986).** Antibiotic tetaine--a selective inhibitor of chitin and mannoprotein biosynthesis in *Candida albicans*. *Arch Microbiol* **145**, 234-40.

- Mio, T., Kokado, M., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (2000).** Reduced virulence of *Candida albicans* mutants lacking the *GNA1* gene encoding glucosamine-6-phosphate acetyltransferase. *Microbiology* **146**, 1753-8.
- Mio, T., Yabe, T., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1998).** The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. *J Biol Chem* **273**, 14392-7.
- Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1996).** Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**, 2416-9.
- Mio, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1999).** *Saccharomyces cerevisiae* *GNA1*, an essential gene encoding a novel acetyltransferase involved in UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J Biol Chem* **274**, 424-9.
- Miyazaki, A. & Ootaki, T. (1997).** Multiple genes for chitin synthase in the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen Appl Microbiol* **43**, 333-340.
- Money, N. P. (1999).** To perforate a leaf of grass. *Fungal Genet Biol* **28**, 146-7.
- Moore, D. (1998).** *Fungal Morphogenesis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (1997).** The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol Gen Genet* **253**, 520-8.
- Motoyama, T., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (1994).** Isolation of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 2254-7.
- Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J., Bulawa, C. E. & Gow, N. A. (2001).** *Chs1* of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol* **39**, 1414-26.
- Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono, N., Sawada, R., Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1995).** Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J Biol Chem* **270**, 13961-7.
- Nasser, W., Tapia, M. d. & Burkard, G. (1990).** Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of 1,3- β -glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chlorid treatment. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**, 1-14.
- Nasser, W., Tapia, M. d., Kauffmann, S., Montasser-Kouhsari, S. & Burkard, G. (1988).** Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases. *Plant Mol Biol* **11**, 529-538.

- Nicholson, R. L. (1992).** *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and *Sorghum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, pp. 186-202. Edited by Bailey & Jeger. Wallingford: CAB international.
- Nicholson, R. L., Butler, L. G. & Asquith, T. N. (1986).** Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology* **76**, 1315-1318.
- Nicholson, R. L. & Moraes, W. B. C. (1980).** Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. *Phytopathology* **70**, 255-261.
- Nicholson, R. L., Turpin, C. A. & Warren, H. L. (1976).** Role of pectic enzymes in susceptibility of living maize pith to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathologische Zeitschrift* **87**, 324-336.
- Ono, N., Yabe, T., Sudoh, M., Nakajima, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (2000).** The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology* **146**, 385-91.
- Orlean, P. (1987).** Two chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **262**, 5732-9.
- Osherov, N., Yamashita, R. A., Chung, Y. S. & May, G. S. (1998).** Structural requirements for in vivo myosin I function in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**, 27017-25.
- Osmond, B. C., Specht, C. A. & Robbins, P. W. (1999).** Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11206-10.
- Panaccione, D. G., McKiernan, M. & Hanau, R. M. (1988).** *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous Benomyl-resistance genes retains expected pathogenicity to corn. *Mol Plant Microbe Interact* **1**, 113-120.
- Panaccione, D. G., Vaillancourt, L. J. & Hanau, R. M. (1989).** Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **81**, 876-883.
- Pang, K. M. & Knecht, D. A. (1997).** Partial inverse PCR: a technique for cloning flanking sequences. *Biotechniques* **22**, 1046-8.
- Park, I. C., Horiuchi, H., Hwang, C. W., Yeh, W. H., Ohta, A., Ryu, J. C. & Takagi, M. (1999).** Isolation of *csm1* encoding a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain from the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *FEMS Microbiol Lett* **170**, 131-9.
- Pascholati, S. F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D. & Nicholson, R. L. (1993).** Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**, 37-51.
- Politis, D. J. & Wheeler, H. (1973).** Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiol Plant Pathol* **3**, 465-471.

- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. & Vai, M. (1997).** Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 463-9.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. & Werner, T. (1995).** MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**, 4878-84.
- Rasmussen, J. B. & Hanau, R. M. (1989).** Exogenous scytalone restores appressorial melanization and pathogenicity in albino mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Can J Plant Pathol* **11**, 349-352.
- Rasmussen, J. B., Panaccione, D. G., Fang, G. C. & Hanau, R. M. (1992).** The *PYR1* gene of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*: selection by intraspecific complementation and sequence analysis. *Mol Gen Genet* **235**, 74-80.
- Riquelme, M., Gierz, G. & Bartnicki-Garcia, S. (2000).** Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkorper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **146**, 1743-52.
- Roncero, C. & Duran, A. (1985).** Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-5.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Santos, B., Duran, A. & Valdivieso, M. H. (1997).** *CHS5*, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 2485-96.
- Santos, B. & Snyder, M. (1997).** Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires *Chs5p* and *Myo2p*. *J Cell Biol* **136**, 95-110.
- Sburlati, A. & Cabib, E. (1986).** Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **261**, 15147-52.
- Schuller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. & Ruis, H. (1994).** The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *Embo J* **13**, 4382-9.
- Seiler, S., Nargang, F. E., Steinberg, G. & Schliwa, M. (1997).** Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *Embo J* **16**, 3025-34.
- Sekiya-Kawasaki, M., Botstein, D. & Ohya, Y. (1998).** Identification of functional connections between calmodulin and the yeast actin cytoskeleton. *Genetics* **150**, 43-58.
- Sentandreu, R., Mormeneo, S. & Ruiz-Herrera, J. (1994).** Biogenesis of the fungal cell wall. In *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 111-124. Edited by J. G. H. Wessels & F. Meinhardt. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A. & Cabib, E. (1991).** The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **114**, 111-23.
- Sietsma, J. H., Beth Din, A., Ziv, V., Sjollem, K. A. & Yarden, O. (1996).** The localization of chitin synthase in membranous vesicles (chitosomes) in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **142**, 1591-6.
- Sietsma, J. H. & Wessels, J. G. H. (1979).** Evidence for covalent linkages between chitin and beta-glucan in a fungal wall. *Journal of General Microbiology* **114**, 99-108.
- Sietsma, J. H. & Wessels, J. G. H. (1994).** Apical wall biogenesis. In *Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 125-141. Edited by J. G. H. Wessels & F. Meinhardt. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Specht, C. A., Liu, Y., Robbins, P. W., Bulawa, C. E., Iartchouk, N., Winter, K. R., Riggle, P. J., Rhodes, J. C., Dodge, C. L., Culp, D. W. & Borgia, P. T. (1996).** The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol* **20**, 153-67.
- Stevens, D. A. (2000).** Drug interaction studies of a glucan synthase inhibitor (LY 303366) and a chitin synthase inhibitor (Nikkomycin Z) for inhibition and killing of fungal pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2547-8.
- Stratford, M. (1994).** Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* **10**, 1741-52.
- Sudoh, M., Yamazaki, T., Masubuchi, K., Taniguchi, M., Shimma, N., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (2000).** Identification of a novel inhibitor specific to the fungal chitin synthase. Inhibition of chitin synthase 1 arrests the cell growth, but inhibition of chitin synthase 1 and 2 is lethal in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Biol Chem* **275**, 32901-5.
- Suresh, K. & Subramanyam, C. (1997).** A putative role for calmodulin in the activation of *Neurospora crassa* chitin synthase. *FEMS Microbiol Lett* **150**, 95-100.
- Talbot, N. J. (1995).** Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends Microbiol* **3**, 9-16.
- Tariq, V. N. & Devlin, P. L. (1996).** Sensitivity of fungi to nikkomycin Z. *Fungal Genet Biol* **20**, 4-11.
- Tellam, R. L., Vuocolo, T., Johnson, S. E., Jarmey, J. & Pearson, R. D. (2000).** Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem* **267**, 6025-43.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M. & Laborda, F. (1998).** Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **144**, 45-53.

- Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A. & Roncero, C. (1997).** Characterization of *CHS4* (*CAL2*), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**, 795-807.
- Trilla, J. A., Duran, A. & Roncero, C. (1999).** Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 1153-63.
- Vaillancourt, L. J. & Hanau, R. M. (1994).** Cotransformation and targeted gene inactivation in the maize anthracnose fungus, *Glomerella graminicola*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3890-3893.
- Valdivieso, M. H., Duran, A. & Roncero, C. (1999).** Chitin synthases in yeast and fungi. In *Chitin and Chitinases*, pp. 55-69. Edited by P. Jollès & R. A. A. Muzzarelli. Basel: Birkhäuser.
- Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A. & Popolo, L. (2000).** Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**, 4752-7.
- Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O., Pataky, J. K. & Guevara-Lara, F. (1995).** Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source--biology, composition, and production. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**, 191-229.
- Vermeulen, C. A. & Wessels, J. G. (1986).** Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. *Eur J Biochem* **158**, 411-5.
- Vidal-Cros, A. & Boccara, M. (1998).** Identification of four chitin synthase genes in the rice blast disease agent *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* **165**, 103-9.
- Vollmer, S. J. & Yanofsky, C. (1986).** Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **83**, 4869-4873.
- Wattad, C., Freeman, S., Dinooor, A. & Prusky, D. (1995).** A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 621-626.
- Werner, S., Steiner, U., Becher, R., Kortekamp, A., Zyprian, E. & Deising, H. B. (2002).** Chitin synthesis during *in planta* growth and asexual propagation of the cellulosic Oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiol Lett*, **208**, 169-173.
- Wessels, J. G. H. (1993).** Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol* **123**, 397-413.
- Wessels, J. G. H. (1994).** Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Ann Rev Phytopathol* **32**, 413-437.
- Wessels, J. G. H. & Sietsma, J. H. (1981).** Fungal cell walls: a survey. In *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*, pp. 352-394. Edited by W. Tanner & F. A. Loewus. Berlin: Springer-Verlag.

- Wijesundera, R. L. C., Bailey, J. A., Byrde, R. J. W. & Fielding, A. H. (1989).** Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum* : their role in the development of bean anthracnose. *Physiol Mol Plant Pathol* **34**, 403-413.
- Wilson, G. W. (1914).** The identity of the anthracnose of grasses in the United States. *Phytopathology* **4**, 106-112.
- Wolkow, P. M., Sisler, H. D. & Vigil, E. L. (1983).** Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol Plant Pathol* **23**, 55-71.
- Woynarowska, B., Witkowski, A. & Borowski, E. (1985).** Differential inhibition of DNA and RNA biosynthesis in HeLa S3 cells by tetaine, a dipeptide antibiotic. *Biochim Biophys Acta* **825**, 199-206.
- Xoconostle-Cazares, B., Leon-Ramirez, C. & Ruiz-Herrera, J. (1996).** Two chitin synthase genes from *Ustilago maydis*. *Microbiology* **142**, 377-87.
- Xoconostle-Cazares, B., Specht, C. A., Robbins, P. W., Liu, Y., Leon, C. & Ruiz-Herrera, J. (1997).** *Umchs5*, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **22**, 199-208.
- Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Nakajima, T., Sudoh, M., Arisawa, M. & Yamada-Okabe, H. (1998).** Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem* **258**, 941-7.
- Yadan, J. C., Gonneau, M., Sarthou, P. & Le Goffic, F. (1984).** Sensitivity to nikkomycin Z in *Candida albicans*: role of peptide permeases. *J Bacteriol* **160**, 884-8.
- Yanai, K., Kojima, N., Takaya, N., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (1994).** Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1828-35.
- Yarden, O. & Yanofsky, C. (1991).** Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **5**, 2420-30.
- Zhang, D. & Miller, M. J. (1999).** Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies. *Curr Pharm Des* **5**, 73-99.
- Zhang, Z. & Gurr, S. J. (2000).** Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. *Gene* **253**, 145-50.
- Zhang, Z., Hall, A., Perfect, E. & Gurr, S. J. (2000).** Differential expression of two *Blumeria graminis* chitin synthase genes. *Mol Plant Pathol* **1**, 125-138.
- Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engle, P., Roe, T., Cyert, M. S. & Levin, D. E. (1998).** Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* **18**, 1013-22.

Ziman, M., Chuang, J. S. & Schekman, R. W. (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**, 1909-19.

Ziman, M., Chuang, J. S., Tsung, M., Hamamoto, S. & Schekman, R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 1565-76.

VII Anhang

VII.1 Zusammensetzung von *Colletotrichum* Nährmedien

VII.1.1 Haferflockenagar

50 g Haferflocken werden mit 500 ml H₂O_{dest} in einem Mixer sechsmal für 20 sec auf höchster Stufe zerkleinert. 12 g Agar-Agar werden mit 500 ml H₂O_{dest} in der Mikrowelle erhitzt, bis der Agar komplett gelöst ist. Beides wird gemischt und mindestens 30 min autoklaviert.

VII.1.2 Kompletmedium (CM)

Für die Stammlösung A werden 50 g Ca(NO₃)₂ in 500 ml H₂O_{dest} gelöst und für die Stammlösung B werden 10 g KH₂PO₄, 12,5 g MgSO₄ und 2,7 g NaCl in 500 ml H₂O_{dest} gelöst. Beide Lösungen werden nicht autoklaviert.

Für das Kompletmedium werden je 10 ml der Lösungen A und B, 10 g Glucose, 1 g Hefeextrakt und 1 g Caseinhydrolysat (Difco Laboratories, Augsburg) in H₂O_{dest} in einem Gesamtvolumen von 1 Liter gelöst und autoklaviert.

Zum Gießen von festen Nährböden wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar-Agar zugegeben. Für die Kultivierung der *ChsC*-defizienten Isolate wurde 0,5 M Saccharose zugesetzt.

VII.1.3 Regenerations- und Selektionsmedium für Transformation

Das Regenerationsmedium enthält 1 M Saccharose, 0,1 % Hefeextrakt, 0,1 % Caseinhydrolysat und 1,5 % Agar-Agar. Zur Erstselektion im Anschluss an die Transformation werden 400 µg/ml, für die weitere Kultivierung der Transformanden 100 µg/ml Hygromycin B als sterile Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) nach dem Autoklavieren zugegeben.

VII.2 *C. graminicola* Isolate

Es folgt eine kurze Beschreibung aller in dieser Arbeit benutzten bzw. durch Transformation erzeugten *C. graminicola* Isolate:

<i>Isolat</i>	<i>Beschreibung</i>
M2	Wildtyp (Panaccione <i>et al.</i> , 1988)
A1.1/2	trägt eine ektopische Integration des Plasmids pTZ Δ chsA
A6.1/2	wie A1
A10.1/2	Isolat mit inaktiviertem <i>ChsA</i> -Gen
A22.1/3	wie A10
B16.1/2	trägt eine ektopische Integration des Plasmids pTZ Δ chsB
B31.1/2	Isolat mit inaktiviertem <i>ChsB</i> -Gen
B33.1/3	wie B31
B37.1/2	wie B16
C19.3/4	trägt eine ektopische Integration des Plasmids pUC Δ chsC
C20.1/2	Isolate mit inaktiviertem <i>ChsC</i> -Gen
C21.1/2	wie C20
C22.1/2	wie C20
C23.1/2	wie C19
C24.3/4	wie C20
GFP1-4	Isolate mit dem Plasmid gGFP (GFP unter der Kontrolle eines konstitutiven GAPDH-Promotors)
AGFP1/2	Isolate mit dem Plasmid pAGFP (GFP unter der Kontrolle des <i>ChsA</i> -Promotors)
BGFP1-5	Isolate mit dem Plasmid pBGFP (GFP unter der Kontrolle des <i>ChsB</i> -Promotors)

VII.3 Primer

Nachfolgend aufgeführt sind die Sequenzen aller Oligonukleotide, die bei PCR-Reaktionen oder Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

A, G, C und T stehen für die Basen Adenin, Guanidin, Cytosin und Thymin. I steht für Inositol. Einige Primer sind an mehreren Stellen degeneriert. Dabei gilt: R = A oder G; Y = C oder T; M = A oder C; D = A, G oder T und N = A, G, C oder T. Unterstrichene Bereiche markieren Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen.

M13 (-21)	5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'
M13 reverse	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
T7	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
pUC18	5' - GTC GAC CTG CAG GCA TGC AAG - 3'
Ptrp	5' - AAT GTC CTC GTT CCT GTC TGC - 3'
hph1	5' - AGC TGC GCC GAT GGT TTC TAC AA - 3'
hph2	5' - GCG CGT CTG CTG CTC CAT ACA A - 3'
hph3	5' - AGC TGC GCC GAT GGT TTC TAC - 3'
hph4	5' - GCT TCT GCG GGC GAT TTG TG - 3'
GFP5'	5' - TAG GTG GCA TCG CCC TCG C - 3'
Gpd	5' - GTC CCT CAG TCC CTG GTA GG - 3'
CHS1	5' - CTG <u>AAG CTT</u> ACN ATG TAY AAY GAR GAY - 3'
CHS2	5' - GTT <u>CTC GAG</u> YTT RTA YTC RAA RTT YTG - 3'
CHS4	5' - AAR CCI GGI AAY MGR GGI AAR MG - 3'
CHS5	5' - GTT RTG IAC IGT IGA RTT DAT CC - 3'
CHSA1	5' - TTA TAC ATG GTA AGC TTC AG - 3'
CHSA1.1	5' - CCT TGC GGT TGC ACA TGT AC - 3'
CHSA2	5' - TCA ACC CAC TGG TTG CGA CG - 3'
CHSA3	5' - GCA GTT GGG CTG GTG AAA GG - 3'
CHSA4	5' - CGC TAT CGG TAA CTT CTT CCT G - 3'
CHSA5	5' - TTG CGT TCG CAG ACG GAC CC - 3'
CHSA6	5' - GTG GGC GTA CAT AAT CAT TGA G - 3'
CHSA6.2	5' - TGG GGC ACA AAG GGT GAC GA - 3'
CHSAr1	5' - GTC ACA AAC ATC AGA CAC CCG T - 3'
CHSAr2	5' - AAC CCC TTC AAC AAC AAC GCT G - 3'
CHSAr3	5' - AAA CTT GGT CCT CGA CTG CCC - 3'
CHSAr4	5' - CAC CAC GGT AGT AGT CCA TCT G - 3'
CHSAr5	5' - TGA AGA CCA GCA AGT CGA GGC - 3'
CHSAr6	5' - CTC GAA GCA CAG AAT ACG ATC C - 3'
CHSA-Hind	5' - GCC ATC <u>GAA GCT</u> ICC CTG TTG G - 3'
CHSA-Eco	5' - GAA AGA <u>ATT CAA</u> CGC AAG CAT GAT C - 3'
CHSA ko	5' - GGT GAG AAG GAG ATG CGT GC - 3'
A-GFP1	5' - CAC GAG <u>TCT AGA</u> AGG GAA AG - 3'
A-GFP2	5' - TTG GGC TGG TGA AAG GAG G - 3'
RTA2	5' - GTT GTC CGC GAC TTC GAC ATG - 3'
RTA2.2	5' - TTG AGA ATG TTG GTG TAT GTG GG - 3'
CHSB1	5' - TGA GGT TGA CAA TGT CGC GG - 3'
CHSB1.1	5' - TTT GCA TGA CAC CGT GAA GGG - 3'
CHSB2	5' - TGG TGC CTG TGG TGA GAT CC - 3'
CHSB3	5' - TGA TTC TGT GAG ACT GTA TGC G - 3'
CHSB4	5' - TTT GGG TTC CTA CTA TCT GAC C - 3'
CHSB5	5' - ACA GAG ATG CAA CGG ACG GG - 3'
CHSB6	5' - GGT TCA GAC AAG ACT GAG GCG C - 3'
CHSB8	5' - CGC TTT CCG ACA TCC TTC AGG - 3'
CHSBr1	5' - ACC CAA CCT AGG TCT CCT TCC - 3'
CHSBr2	5' - GTT TAG CCA GGA GCT CGA CTC - 3'
CHSBr3	5' - GAT TGT CGT CTG TCT CGT TTT CG - 3'

CHSBr4	5' - AAC GAC GAC GCT GGC TGA TG - 3'
CHSBr5	5' - CTG TCG AGG CTG ATC TGC TGG - 3'
CHSBr6	5' - TCG AAG TTA TCG CTT GTG ATG AC - 3'
CHSBr7	5' - TCT AGA CAG CAT GGT TGG AAT GG - 3'
CHSB-Acc	5' - ACA TCT TCG AGT ACA CCT CCC - 3'
CHSB-Eco	5' - GTC TGA ATT CTC TAC AGC AAC TGC - 3'
CHSB-Xba	5' - CGC TTA GAA GTG GTT TGT CAG G - 3'
CHSB ko	5' - TCT CTC TCG CCC ACT GCT AG - 3'
B-GFP1	5' - CTG TCT TIC TAG AGC AAC TGC - 3'
B-GFP2	5' - TCC TCC ATG GTG TGG CCA TC - 3'
RTB1	5' - CCT GCT GGG ACT GGC AGA TAC - 3'
RTB2	5' - CGC GGA TGT TTT GCA TGA CAC C - 3'
CHSC1	5' - GAT TTG ATG ATA GAT CTC GAG C - 3'
CHSC2	5' - CCA TTG CAC CCG ACT CTT GG - 3'
CHSC2.1	5' - CCT GCA CCA TTG CAC CCG AC - 3'
CHSC2.2	5' - CAA CGC CAA GGC ATC GTT CAT C - 3'
CHSC3	5' - TTA CGC GTG TCG ACG TCG CC - 3'
CHSC4	5' - GAA GAT TGT CAT ATC CGA CGA GG - 3'
CHSC5	5' - TTC TTC AGC TGC TTG ACT GTG AC - 3'
CHSC6	5' - AGC GCT GCT GTC TGG CCA ATT G - 3'
CHSC7	5' - CTA GGC CAG TGC TTG TCT TCG - 3'
CHSC8	5' - ACG TTC CAG TAC AGG TTG CGC - 3'
CHSC9	5' - GAG CTA ATG GTC GCC TGC ATG A - 3'
CHSC10	5' - TGC CTC ATC CAT CAT GCA ACA AC - 3'
CHSC11	5' - CTC GTT CTC TAG CAT ATC GGC C - 3'
CHSC12	5' - ACC AGC TCA CAC CGT CTA CAC - 3'
CHSC13	5' - TTG TGC CCG CCA TCA GGT AGT A - 3'
CHSC15	5' - CCC CGC TGT TTC CAC CGA TG - 3'
C3.1	5' - AAG AAC CTG CTC CAC CTG GGT GAG GAT C - 3'
C3.2	5' - TGA CGA CAC TGC TTC TCA AGT TCC ACA AC - 3'
C5.1	5' - TGG GAC AAA TGA GCT TCG GGA AGA TGA C - 3'
C5.2	5' - GAA GAA GGC CGC GAA TAG ACA GAA CAG C - 3'
CHSCr1	5' - AGC GAG CGT CCT CCT TGT TC - 3'
CHSCr2	5' - CCG CCA TGG AAT CGG CAG TCC - 3'
CHSCr3	5' - CCC CAT GGA CGG CGA GAA GG - 3'
CHSCr4	5' - AGC AAA AGT GTG AGA AGT CGA G - 3'
CHSCr5	5' - GGT CAT CCC ACC CAG CTC AAG - 3'
CHSCr6	5' - ACT TCT TTG ACC GCA AGG CC - 3'
CHSCr7	5' - TTC TCA GGA CGA GCT CGA CAG - 3'
CHSCr8	5' - CCT TCT TCA TCG TCA TCT TCC - 3'
CHSCr9	5' - TTT TGG GTG GCC GCG TTT ACG - 3'
CHSCr10	5' - CAT TCT CGG CGT CTC TGA CAC - 3'
CHSCr11	5' - GCA CCA AGC TGT GAA GCA TAC - 3'
CHSCr12	5' - TAG TTA TAG AAT CAC CAA CCG C - 3'
Cko	5' - TCT CGC TCA ACA CAT ACA CTT C - 3'
RTC2	5' - CAA GCA GCT GAA GAA TTA CGC C - 3'
CHSD1	5' - ATC AAA TAT TCG TAC AGC TCG GG - 3'
CHSD2	5' - ACC CGA GTC CTG GAG CGT CC - 3'
RTD1	5' - CCG AGC TGT ACG AAT ATT TGA TG - 3'
RTD2	5' - GTG CCG CGG TTT GAC AGT AGG - 3'

VII.4 Sequenz der *Chs*-Gene

VII.4.1 *ChsA*

Die 5'- und 3'-nichttranslatierten Bereiche sowie die Introns sind in kleinen Buchstaben geschrieben. Die konservierten Intron-Erkennungssequenzen sind unterstrichen. Die Bindestellen für die Primer CHS1 und CHS2 sind eingerahmt. Einige stark konservierte Aminosäuren, die wahrscheinlich für die katalytische Aktivität wichtig sind, sind grau unterlegt. Die beiden Schnittstellen (Cfr42 I und BamH I), die für die Konstruktion des *knock-out* Vektors genutzt wurden, sind doppelt unterstrichen. Die Sequenz wurde in der Genbank unter der Zugangsnummer AY052545 abgelegt.

```

cttgcccttgcaaaaggaggtaagcagcagcaagaagggaagaagg -901
gacagaaaaaaggaggaagaaaaagaaaaagaaaaaaggccctacttacattctggcagcgtgccaaggtaaggatcagcaaggat -811
cgtcgcggaaggggaaacaagtaacaggggctcagctgaggttgaaccgctgacaagaccgacccccgacatctgcgactgcgactgc -721
gactgcgactgcgactgcgactttgagaccggctcggatccaacagtcccaactctctcccacacctatctatccactttccatctcga -631
cgtcccttcttgccctctcatctcgcgacacacaggtgcccacacaacgagcctcctaagtggccactacctttctgcacagcagggcgca -541
tccgctacaaaagccaaaacctagaagcacataccgctctccccgagggagcggatcgccctacctgatccatctcatatccaccgag -451
gctctccctagtcacaaaacatcagacaccgctcttttgatgaaaccctcaatccatctcaaacatgctgataatcgtttagcaagt -361
tacatggtgctccctctatgatatggctctccggcgctactcctcccaatccccctctctctctcccgacaaaagccccgactgggt -271
ccgtctcggaacgcaacctgggtgctgctggttcaaccatctgcaatccgctcccaaccgactgaccttttgcaagagcgtgcttt -181
gcttgcgttgaggagtcgaatacgcgaacttctgctggcgcaacctctctctctccccctctacatacaaatctttctttcttcttct -91
tgacgcatactctctacgtctcgggtgacttggccagacagcgaatcctaacattctccccccacagacgacgatattatacaacgacgcg -1

ATGGACCCAGGTACCATCGCACGCCTTACCAGGCCAGCCGCTTCAACATGGCTACCAAGTTGGAGGACAACCCCTTCAACAACAACGCT 90
M D P R Y H R T P S P G Q P L Q H G Y Q L E D N P F N N N A

GCCTATCAGCCTCGGCCCAACATGACCCTTACGGCCATACCAGCCCCACCAGCAGCTCGATGTCCCATGGGACCGCCAGCTCGGTAT 180
A Y Q P P P Q H D P Y G H T S P H Q Q L D V P M G P P A R Y

GGCAGCCTAGTGACCAACTACCGTTGAATGCAGCGgtaagtctgttccaacgctctctttaccagcccaactgctaaatctgctcccgcta 270
G T P S D Q L P L N A A Intron 1

ttagCACTCTGTGACCAACTGAGTGGATACGACACACCCGTCAACCAGGCTGACTATGGTGTCAACCCGGAGGCGCATCACGATGCCTA 360
H S V S N L S G Y D T P V N H G D Y G V N P E A H H D A Y

CTACAACCAGCCTTACGAGCCTTACCCACGATCCCTCGGTGCCCTATGACCAGCCACCGGTTACAGCGAGTATGACGACAACAGGCC 450
Y N Q P Y E P S P H D P S V P Y D Q P T G Y S E Y D D N R P

GATGCTGCCTACCAAGACACCACCGACGGATACCAGGACAACCCAACACCGCAGCCCGCCGGCGCCTCAAGAGGTGGAAGACCGTCAA 540
M L P H Q D T T D G Y Q D N P T P Q P A G G L K R W K T V K
Cfr42 I
GCAGGTGCTGCTGATCCCGGAAACTTGGTCCCTCGACTGCCCGTTCCCCCAGACTACTCAACCAGATTCCCCACGGCGAGCGCGACGA 630
Q V L L Y R G N L V L D C P V P P R L L N Q I P H G E R D E

GTTACCCACATGCGCTACACGGCGGCCACTTGCAGCCGAATTACTTCTATGATGACAACTTACGCTACGACAGAAGCTCTTCTCAA 720
F T H M R Y T A A T C D P N Y F Y D D N F T L R Q K L F S K
CHS1 -
GCCAGGCACACGGAGCTCTTTATCGTAGTGACCATGTACAATGAGGATGAAATCCTGTTGCGCGAACAATGATTGGTGTCTCTCAAGAA 810
P R H T E L F I V V T M Y N E D E I L F A R T M I G V L K N

CGTCGAGTACATGTGCAACCGCAAGGAGAGCAAGACATGGGGCAAGGACGCATGGAAGAAGATTGTCGCTGCGTTGTCAGTGACGGTCCG 900
V E Y M C N R K E S K T W G K D A W K K I V V C V V S D G R

TGCCAAGATCAACCCGAGAACCAGAGCTCTGCTGGCCGGTATGGGCGTCTATCAGGAGGGCATTGCCAAGCAGCAAGTCAACGGCAAAGA 990
A K I N P R T R A L L A G M G V Y Q E G I A K Q Q V N G K D

TGTCACGGCCACATTTACGAGTACACGTCCCAGGTCCGAATGATGATCAAGAACGACGTTGTTACGTTGGTCCCAAGCAGCAGCCCGT 1080
V T A H I Y E Y T S Q V G M M I K N D V V T L V P K Q Q P V

CCAGATGTTGTTCTGCTTGAAGGAAAAGAACGAGAAGAAGATCAACTCTCACAGGTGGTTCTTCCAGGCATTCCGCCGCTTCTCGACCC 1170
Q M L F C L K E K N Q K K I N S H R W F F Q A F G R V L D P

CAATATCTGCGTCTTATCGATGCTGGTACTAAGCCTGGTGGCAACTCCATCTACCACCTATGGAAGGCATTCCGACCTTGAGCCCATGTG 1260
N I C V L I D A G T K P G G N S I Y H L W K A F D L E P M C

```

- CHS2

TGCCGGCGCTTGC GCGCAAAATCAAGGCCATGTTGGAAACGGGTGGAAAGCACCTCCTCAACCCACTGGTTGCGACG CAGAACTTCGAGTA 1350
 A G A C G E I K A M L G T G G K H L L N P L V A T Q N F E Y

CAAGATGAGCAACATCCTCGACAAGCCGCTGGAATCTGCCTTTGGCTTCAATTTCCGTTGCCCCGAGCCTTCTCCGCCTACCGTACTGTT 1440
 K M S N I L D K P L E S A F G F I S V L P G A F S A Y R Y V

TGCCCTGCAGAACGACAAGAACGGGCAGGGTCCATTGGAGAAGTACTTTGCCGGCGAGAAGCTCGAGGGTCTGGTGCCGGCATCTTAC 1530
 A L Q N D K N G Q G P L E K Y F A G E K L E G A G A G I F T

GTCCAACATGTATCTCGCCGAGGATCGTATTCTGTGCTTCGAGCTTGTCACCAAGCGTAACTGCCATT GGATCCTTCAAGTATGTC AAGTC 1620
 S N M Y L A E D R I L C F E L V T K R N C H W I L Q Y V K S
 BamH I

CGCTACTGGCGAGACCGACGTGCCGGACACTGTACCAGGTTGGTCTCCAACGTCGTCGTTGGTTGAATGGTTCTTTCTTTGCTGGTAT 1710
 A T G E T D V P D T V T E L V L Q R R R W L N G S F F A G I

CTACGCCATCGCCACTTCTACGAGTTCTTCCGGTCCGATCACTCCATGCTGCGAAAACCTGATGTTCTTCGTTGGAGTTCTGTTCAACAC 1800
 Y A I A H F Y E F F R S D H S M L R K L M F F V E F V F N T

GATCAACCTCATTACGCTGGTTCCGCTATCGGTAACCTCTTCCCTGGTTTTCAAGATTCTGACGACAAGTTGGGCGACGACAACCTTGTCT 1890
 I N L I Y A W F A I G N F F L V F K I L T T S L G D D N L L

TGGTAGAACCGGCGAGATCCTTGGTGTCTTCACTTGGGTATACGGTATTGCTCTGATAACGTTTCTGTTCCATGGGCAATCG 1980
 G R T G E I L G V V F T W V Y G I A L I T C F V L A M G N R

CCCAGCCGGCTCGGGGCGTACTACATCAGGATGGTTTACTTCTGGGCCCTTTATAATGAT gtgagtttgtttgcctcgacttgctggtct 2070
 P A G S G P Y Y I T M V Y F W A F I M I Intron 2

tcagctaatcctttgagCTACCTGTTGTTTGGCCGCTTTTTCATCGCCGTCAAAGCTATCATCGCTGACGTCCAGACTCCAACGGCTT 2160
 Y L L F A A V F I A V K A I I A D V H D S N G F

CAATATAACCGATCTCTTCAAGAATCCCGTGTCTACACCCCTCATCATCTCCGTCATGTGCACTTATGGCATTGGCTGATTGCCTCGCT 2250
 N I T D L F K N P V F Y T L I I S V M S T Y G I W L I A S L

GCTGATGTTCCGCCCTTGGCACATGATCACGCTTTTCGTTTCACTACATGCTCCTGACGCCACATACACCAACATTCTCAACGTCATCGC 2340
 L M F D P W H M I T S F V Q Y M L L T P T Y T N I L N V Y A

GTTCTGCAACACTCACGACATTTCTTGGGGCACAAAGGGTGACGACAAGGCCGAGTCGCTGCCACGGTCAGCACCAAGGACGGTTCCGG 2430
 F C N T H D I S W G T K G D D K A E S L P T V S T K D G S G

AAAGACGGATCTCCCGGACGAGGCCGATCTTAACGCGCAGTACGAACGTAACCTACGGTCTTTCAGCACCAAGTTCTGTAAGGAGGTCAA 2520
 K T D L P D E A D L N A Q Y E R E L T V F S T K F V K E V K

GGCGCCGACCGAGTCGCACTGGCCGAGGCTCAGATGGACTACTACCGTGGTGTTCGTTCTGTGTCGTCGCTGGCTTGGATGATTCCAA 2610
 A P T E S Q L A E A Q M D Y Y R G V R S V V V L A W M I S N

CTTTGGTCTTGTGCTGCGTCTCAGTCCCGCAGGCTCTGGAGAGGATAAACCCCGCTGCAAACAGCACTGACGACGTTGATGGCCGTGC 2700
 F G L A A V V L S A A G L E R I N P A A N S T D D V D G R A

CAACATCTACATGTCCGTTAGTGTCTGCT 2790
 N I Y M S V V L W S V A G L S S F K F I G A M W F L V V R M

GTTCAGAGGTGTTTAAATcgcccggggtgataatcgacctgccgacgaaggaacgcttatcttcgcctattgggtgttttatgacgatt 2880
 F R G V

tc aattgtgagcattataaccgcctctttccggaggaaagggcctgggtggacggtgaacacggccttttgggagttttcagctctcatgat 2970
 gtatggagtaagaccgcctggggtggcgggtggatgtaactctaatgactttttctttttcttttacgcgtttctggatcatgcttgcc 3060
 ttgggtcttttctctttgccaatctgca

VII.4.2 ChsB

Für die Markierungen gilt dasselbe wie bei *ChsA*. Für den ko-Vektor wurde der Bereich zwischen den Schnittstellen *Acc65 I* und *Nde I* durch die *Hyg^R*-Kassette ersetzt. Die Sequenz wurde in der Genbank unter der Zugangsnummer AY052546 abgelegt.

ggtctcacctccttctcatccccgagtgtccaagcggggaagcgatgaccagtgattacggagtactccttattctcatctttt -721
 ccccttctcatcttctcaccctctcacagctctcgctctctctcgccactgctagctactgttgtgtctgtcttctctacagcaactgctt -631
 ctgtctggtaagtaagctacctcgttcacggcacagtcgaatctgttttctactgctatttacgcactttacctactgtctagt -541
 agtgtatttaccgatctacggatgcccctagctccagctggcatgactccagggctatcccaatcttctctagccatccccactgccc -451
 tctcttgttcccactcccactcccacacccacacataggccaggtgccagcttccaccagtaaaagctgccagcccgaagaccctttttt -361
 aaccatttctgctccccgttctgctgctgcccctctcccctctctcccagccttcccgttccgttgcactctctgtttttctctcccc -271

ttccatctttcactttcaccactcattaccggggtcggtggtttccaggcctgcacatctccaacctacaagcgctttgttcgcgcca -181
 accccatctttccagtcctaaccacccaacctaggtctcttcccggagtccttctgatcgttaataataatcagcgtcgcctctccta -91
 atccccggttttcgcaagcaggcaacccccgctcatcgtttcctcgtattcctattagcatcagctactccgagccttgcccccagcaat -1

ATGGCTTACCGTGGGGGGCATGAGAACGATTATGATGGCCACAATATGACAGGACCTCCCTGCTGGGACTGGCAGAGtaagccttgaaaagc 90
 M A Y R G G H E N D Y D G H N M Q D L P A G T G R

ctttctcaacaacccaaaagctccttcagtcgctaacttgcttgctttcagTACCACCTGCCGCCCCAGGACGAGGGAGTCGACGATGT 180
 Intron 1 Y H L P P Q D E G V D D V

TGGCCAGTCATTGCTGAGAGACCCTCACGCACCTGGCCCTTACGAGAGCCATCTCGGACCCGCTGAAGTCCCGGCCGCCCTGTTTCCGC 270
 G Q S L L R D P H A P G P Y E S H L G P A E V P G R P V S A

ATACAGTCTCACAGAATCATACGCACCTGGTGGCGGTGCCCGACACCAGTTCCCGGCGAGACGGCCTTCGCCTCTGGGTTTAGCCAGGA 360
 Y S L T E S Y A P G A G A R T P V P G E T A F A S G F S Q E

GCTCGACTCAGATGCCAACGGTGGCTTTGGATACGGCCGACCCGCTTCCACCGTCGACGCCGACGAGAGCTGGACCCGACAGACGAACC 450
 L D S D A N G G F G Y G R P A S T V D A D E S W T R R Q Q P

CGGCCACCAAGCTGGCGGTCTGAAGCGATATGCCACCCGTAAGATCAAGCTTACTCAGGGCACCGTCTGAGCATCGATTACCCCGTTCC 540
 G H Q A G G L K R Y A T R K I K L T Q G T V L S I D Y P V P

TAGTGCCATCAAGAACGCGTCCAGCCCAAGTACCGCGACGTCGAAGGCGGCAGCGAGGAGTTTATGAAGATGCGTTACACGGCCGCCAC 630
 S A I K N A V Q P K Y R D V E G G S E E F M K M R Y T A A T

CTGCGACCCCAACGACTTACCCTCAAGAACGGTTACGACCTGCGCCCCAGAATGTATAACAGACACACTGAGCTGCTCATCGCCATCAC 720
 C D P N D F T L K N G Y D L R P R M Y N R H T E L L I A I T
 CHS1 -

CTACTACAACGAAGACAAAGGTGCTGCTGTCCAGAACCCTTACCGGTGTCATGCAAACATCCGCGACATTGTCAACCTCAAGAAGTCCAC 810
 Y Y N E D K V L L S R T L H G V M Q N I R D I V N L K K S T

TTTTTGGAAACAAGGGTGGCCCCGCTGGCAAAAGATTGTCGTCTGTCTCGTTTTCGACGGTATCGAAAAGACCGACAAGAGCGTCTTGG 900
 F W N K G G P A W Q K I V V C L V F D G I E K T D K S V L D

CGTTCTGGCCACTGTCCGTATCTACCAGGACGGTGTGGTGAAGAAGGACGTCGACGGCAAGGAGACTGTGCCCCACATCTTCGAGTACAC 990
 V L A T V G I Y Q D G V V K K D V D G K E T V A H I F E Y T

CTCCCAGCTGTCCGTACCCCCAGCCAGCAGCTCATCCGTCCCGTCGACGACGGCCCTCGACCTGCCCCCTGTGCAGTTCATTTTCTG 1080
 S Q L S V T P S Q Q L I R P V D D G P S T L P P V Q F I F C

CTTGAAGCAGAAGAACAGCAAGAAGATCAACTCCCACAGATGGCTGTTCAATGCCTTCGGTTCGCATCCTGAACCCGGAGGTCTGCATTCT 1170
 L K Q K N S K K I N S H R W L F N A F G R I L N P E V C I L
 Acc65 I

CATCGATGCCGGTACCAAGCCAGCCCTCGATCGCTGCTCGCGCTCTGGGAGGGTTTTCTACAACGACAAGGACCTCGGTGGTGCCTGTGG 1260
 I D A G T K P S P R S L L A L W E G F Y N D K D L G G A C G
 - CHS2

TGAGATCCATGCAATGCTTGGAAAGGGAGGCAAGAAGCTTCTCAACCCCTCGTCGCCGTGCAGAACTTTGAGTACAAGATCTCCAACAT 1350
 E I H A M L G K G G K K L L N P L V A V Q N F E Y K I S N I

CTTGGACAAGCCCTCGAGAGTTTCGTTTCGGTTACGTCTCCGTGTTGCCTGGTGTCTTCTGCTATCGCTTCCGCGCCATCATGGGCCG 1440
 L D K P L E S S F G Y V S V L P G A F S A Y R F R A I M G R

TCCGCTTGAGCAGTACTTCCACGGCGACCACACTCTGTCCAAGATTCTCGGTAAGAAGGGCATCGACGGAATGAACATTTTCAAAAAGAA 1530
 P L E Q Y F H G D H T L S K I L G K K G I D G M N I F K K N

CATGTTCTTGGCCGAGGATCGTATTCTTTGCTTCGAGCTGGTGCCTCAAGGCTGGCCAGAAGTGGCACCTGTCTACATCAAGGCCGCCAA 1620
 M F L A E D R I L C F E L V A K A G Q K W H L S Y I K A A K

GGGTGAGACCGACGTTCCCGAGGGTGGCGCAGAGTTTCATCAGCCAGCGTCTGCTGGTCAACGGTCTTTTGGCCGCTCCCTCTACTC 1710
 G E T D V P E G A A E F I S Q R R R W L N G S F A A S L Y S

GCTCATGCACTTTGGTCGCATGTACAAGTCTGGCCACAACCTTGTCGGCATGATCTTCTCCACATCCAGCTCGTCTACAACATCCTCCA 1800
 L M H F G R M Y K S G H N L V R M I F F H I Q L V Y N I L Q

GGTCTCTTTACATGGTTTCAGTTTGGTTTCCTACTATCTGACCACGACCGTTATCATGGACCTCGTCGGTAACCTGTGCTTTTCTGAGGA 1890
 V L F T W F S L G S Y Y L T T T V I M D L V G N P V V S E D

CCCTAAACTGGCTCGTACGGCTGGCCTTTTGGCGACACGGCGACGCACATTTTCAACGCTCTGCTCAAGTACCTCTACCTGGCCTTTGT 1980
 P K L A R H G W P F G D T A T H I F N A L L K Y L Y L A F V

CATCCTGCAATTCATCTTGGCCTTGGGTAACAGACCCAAGGGTTCCAAGTACACCTACATCGCCTCTTTCGTCGCTTTCGGTCTCATCCA 2070
 I L Q F I L A L G N R P K G S K Y T Y I A S F V V F G L I Q

GTCTATATCCTGATTCTCTCGATGTACTTGGTTGTTACGGCTTTCCAGACGCCCTTAGCCAGCAGATCAGCCTCGACAGTGGCAAAGGA 2160
 S Y I L I L S M Y L V V Q A F Q T P L S Q Q I S L D S G K D

CTTTGTCAAAGCTTCTTCGGCGGCACGAACGCCCGCGGTGTAATTCTCGTCGCCCTGGTTACCATCTACGGTCTGAACCTCATTGCCTC 2250
 F V Q S F F G G T N A A G V I L V A L V T I Y G L N F I A S

Nde I

CTTCATGTACCTCGACCCTTGGCATAAIGTTTACCTCCTTCCCCACTACCTGTCTCATGTCGACTTACATCAACATTCTCATGGTCTA 2340
 F M Y L D P W **H M** F T S F P H Y L V L M S T Y I N I L M V Y

CGCCTTCAACAACTGGCACGATGTGCTCGGGTACGAAGGGTTCAGACAAGACTGAGGCGCTACCTTCTGCACAGGTCAGCAAGGGTGA 2430
 A F N **N W H D V S W G T K** G S D K T E A L P S A Q V S K G E

GAAGGATGAGGCCGTGGTAGAAGAGATCGATATGCCACAGGAGACATTGACAGCCAGTTCGAGTCGACCGTCAAGCGAGCTCTGGAGCC 2520
 K D E A V V E E I D M P Q E D I D S Q F E S T V K R A L E P

ATTC AAGGAGGTGGAAGAGGTTGAAAAGCCCGACATTGAGGATTCTTACAAGTCTTCCGTACCGGTCTGGTCTGAGTTGGCTCTTCTC 2610
 F K E V E E V E K P D I E D S Y K S F R T G L V V S W L F S

CAACACCTTCTCGATTATGTATCACAAGCGATAACTTCGACTCATTGGAATCGGCgtaagttgcccgtctctcagcgatattttatg 2700
 N T F S I I V I T S D N F D S F G I G Intron 2

catTTTTgctgacacctgttctttagGAGAGCTCATCCAAGCGTACCGCGTCTTACTTCAGCTTCTTGTGCTACTCCACTGCCATCCTCTCG 2790
 E S S S K R T A S Y F S F L L Y S T A I L S

TTGGTCCGTTTTCTTCGGATTCTTATGGTCTTGGGCGAGAACC GG TATTATGTGCTGCTTCGCCAGACGGTAAggggccttgggantgtagt 2880
 L V R F F G F L W F L G R T G I M C C F A R R .

atccagatggcagacgcctttccgacatccttcaggagggttttcagaggaagactgtattcttgccagtttaggccattgtaacaa 2970
 tccgcgggtggttacttttggcgatatagttttgtaataaggacacgggctcagtagattcttgatgaattgggtggaagatgagtaaa 3060
 aagtagtttcgattaagcagcattcattggcgcttctcactagatgacatacccttaggtttatttccagacaatgaccattccaacct 3150
 gctgtctagagttttctgtgtagtgagtgcttgccttgagaaacctgacaaaccacttctaagcggcgctcagagtccttagttaggcag 3240
 gcaatgagcagacaacggcggttacggagcttctcctatataaaaaaagggtccattttctatgattcgggaactgaaccagcagacaaa 3330
 cgagagtggtttttttagcttttctcgcgagactatcttctgtagaccannntccctcagacgccccggcgctccaaccaaggg 3419

VII.4.3 *ChsC*

Für die Markierung gilt im Wesentlichen dasselbe wie bei *ChsA*. Zusätzlich ist noch die ATP-Bindestelle („*P-loop*“) in der Myosin-Domäne grau unterlegt. Die Aminosäuresequenz der Myosin-Domäne ist grau geschrieben und der Übergang von der Myosin- zur Chitin Synthase Domäne ist zusätzlich durch einen Pfeil bei Position 2410 markiert. Bei den markierten Primern handelt es sich nun um CHS4 und CHS5. Der deletierte Bereich für den ko-Vektor liegt zwischen den beiden Sal I Schnittstellen. Die Sequenz wurde in der Genbank unter der Zugangsnummer AY052547 abgelegt.

atgcatacctaactagtgatccgatactacatgtgtacggatatacttaccactctacgtacctagctacgatgggggttggaccg -2315
 tgggtaattggagtgaaagagacacagggacagggagctttacggggaatccaccgcggatcgtaaaagcccatcatgtgaagcat -2226
 tgatcacggacagggcaacttcgccgagctttttttggaccttttagcggccgatgggaattgaccgcgtgcttccagacccccgttg -2137
 gtaaatatcccgtacc taggtaagcaaaagccacggccccctttctcaattttcttctcactctcctgaagggtagctaccacagctg -2048
 caaagaaagcactggggacatcaaggaccgagcaccgcacatcaggggaacccgcagatataccaatctcccacactgtctggactgtg -1959
 taccggctacttaggtatctctatattgagacgacaatgggtcaaggtacatcccgaacc tacagcagccagcagcagcggcgccgc -1870
 cgtcttccactaccgcatccagcagggggagctccgccacggcttgaccgctctgcatcacaacaccatctgctccatccatc -1781
 atgcaacaacacatcattctgcccacaac tcagaagcagcttcagcataccggcggtgcgggtgatgcactctggacaacaacatgcttg -1692
 ccatacttacagctacaccgcggcgaggctaaaaaaagcatttgggtaaaagatagcatatccagcattctctgacgcaccctgacc -1603
 gccgaggtcattggagtgatctgattctcactattcttccagactggctacatcattaaatctcaatcactatgtgtgaacagctcaaat -1514
 ctttgactttgggagatctccatgagccataaccctgaacacgatcgatataccgagtgatttggctctcagataatagccccggagcg -1425
 gtgtcagccgctccttgggcttttactatctcactgtgctcactcgtcattgttttctctctgacgggcttaaccctacttaacttt -1336
 catggagctttggtagctcaaacccggggcgctccccctggaacttttgcggcagcgtggagacgcttaccagtgccacatcttaagctcc -1247
 agccgtaaatctcaegcccgactactttgccaaaccgcttggctcaaacaccagccccgggtaccggtgcaaacggcgcttacgactgt -1158
 aaagacgcgggacattcggcaccaccagctcacaccgctcactgcccgtgagactcgagtgcccggtggacagacgcccgtgtgtatg -1069
 caccctcgactcgcgcagccggggcagcaaatgtacatagtggttaagtcgcttgcagacgcgtacatctcaagctgggctg -980
 ccagac tagggccatacagactctcgacaggccaccaatacttaccacaccggc tgggtccagtgctactcgatgtgtcattagtt -891
 ggttaaggtatacaaaagacacagtgccggtgtgaacagggcttctgctcagccagatcattaaaagaagaaaggggagaaaaatcgagaag -802
 aaaatcgagcaggggtaccgtccgctcagctattctcatttcccgatcgagccccctttagggcggcagctcagctctgggaaatggaccg -713
 agaccacaagggacagagagtggtgtgtagcaggtacgcagcagcctcggggagtcagctcagctcaggggataatccacagatgtg -624
 ggtgtgcccgggtggcacagagttcgataggactgctgctgctcttatgttcgtaaccgcccggaccgagaaacggggtgcccgtgaa -535
 gaaaacaatcccccttcttgggtaccacactctctgectctgctcactgcccgtgtaaccccccgctcaacccccaccctctcttggct -446
 tgtgctcccccttaccacagagggcgaagagtgaaagagagagagcaaaagtgtgagaagtcgagactggcttgacctggagagcaaccg -357
 ctctgctgcttccgctgcatctagcttcttcccacattcagcttgccatccccctatcgctatcccaaatcctcactcgtttcccctac -268
 ttctcgcgcgcaactggtttgcttgtctcgcaactgacatgcttctgctttgggttttcgaaacaccctctctgtttactccatg -179
 cgtcaacaactaatccaatcactgagatctatacaccagctctcttctcctccgacgaacctcgactagttcatctctgactcaagt -90
 ctctcgcggcagctcggccctgccatgtatgtattacacaacgcgtatctggagttcatcaagcagagctggcggcgctgctgcccacc -1

ATGGCGATGAACCTGCCACCCATCGGTGGAACAGCGGGGGCGCCATACTCAACCTTCTACCTCGTGCCCGCACATTACAATCC 90
 M A M N L P P I G G N S G G A H T Q P S L P S L P A H S Q S
 GACACGCAGTTGACAGCACACCTGGCAAGTCGCTTCCATGTGTGCTGCCAACCGCTCGCTCTCATCCACGCGCTCATCTCGCTCAAC 180
 D T Q L T A H L A S R F H V S L P T A R L S S H A L I S L N
 ACATACACTTCTTCGCGAAGGGCCCTGATGGCGGCAAGGACGGAAGCGCCATGGGCGGCGCGAGGATATCGCAGACCGGGCTTGGATC 270
 T Y T S S A K G P D G G K D G S A M G G A E D I A D R A W I
 AGATTGGGCCACAGATCTGAGAACCAGGCGGTTGTTTTCTTgatatgtcctctgaggttgatgtattggaattcgacaacataaacacg 360
 R L G H R S E N Q A V V F L Intron 1
 tggatagGGGTGAATCTGGCTCGGGAAAAGTCGACTATCCGATCCACCTCTGACTGCGTTTCTCGGCAATCGTCCACTCCGCTCTCTA 450
 G E S G S G K S T I R S H L L T A F L G K S S T P L S
 CCAAGGTTTCCCTAGCCGCTACGTTTTGATACCTTGACCACGACCAAGACAGTACCCTCCACGCGCTCAAAGGCAGGCTTGTCT 540
 T K V S L A A Y V F D T L T T T K T A T T P T A S K A G L F
 ATGAGCTGCAATATGATACGGCCACTACGACCAATCCAGTCTCATTGGTGCCAAGCTCCTCGACCACAGACTTGAGCGCAGCCGTATCA 630
 Y E L Q Y D T A T T T N P V L I G A K L L D H R L E R S R I
 CGGACATCCCGACGGGAGAGCGCAACTTCCACATCCTGTACTACTGTAGGCCGCGCACAGCGCGGGAGAAGTCCCATCTTGGTTTCG 720
 T D I P T G E R N F H I L Y Y L M A G T S A A E K S H L G F
 AGACGCCGGCAGGTGTGCGCCAGAAGAGATGGAAGTACCTGGGTCATCCACCCAGCTCAAGGTGGGTATCAACGACGCCGAGGGCTTCC 810
 E T P A G V A Q K R W K Y L G H P T Q L K V G I N D A E G F
 AGGTTTTCAAGAACGCCCTTAAGAAGCTTGAATTTCTCGCAGCGAGATCGCCGAGATTTGCCAGATACTCGCCAGCATTCTGCACATCG 900
 Q V F K N A L K K L E F P R S E I A E I C Q I L A S I L H I
 GTCAGCTTGAGTTCGAGACCACATCCGATACGCAAGCCACCGGCGACGACAGCGGTGGCTTCTCTCACGAGGGCGGTGACTGTGACGG 990
 G Q L E F E T T S D T Q A T G D D S G G F S H E G G Q T V T
 CTGTCAAGAACAAGGACGTTCTCGGCATCGTCGCCGCTTCTTAGGCGTCGGTACCCAGGACCTGCAGACTACTCTGTCTTACAAGACGA 1080
 A V K N K D V L G I V A A F L G V G T Q D L Q T T L S Y K T
 AGATGATTCACAAGGAGCGAGTCAACATCATGTGGACCCCGTTGGCGCCGCTCACACGCCAACGAGCTCGCCCGCACGCTCTACTCCC 1170
 K M I H K E R V T I M L D P V G A R S H A N E L A R T L Y S
 TCTTGGTAGCGTACATTTGAGGATCCATCAATCAGAGGATCTGCGCTCCGGAGGAGAACGTTGCCAACACCATCTCCATCATTGACTTCC 1260
 L L V A Y I V E S I N Q R I C A P E E N V A N T I S I I D F
 CTGGATTCGCCCAGCAAGCGGCCACCCATTGCGGCTGGATCAGCTGCTCAACAACGCTGCTGCGAGGGCGCTTTACAATCTAACTCTAC 1350
 P G F A Q Q A A T H S A L D Q L L N N A A C E A L Y N L T L
 AAAAATCTTTGACCGCAAGGCCGATATGCTAGAGAACGAGGAGTCAAGTGTGGCGCCACGAGCTACTTTGACAACCTCGGACGCGCTCC 1440
 Q N F F D R K A D M L E N E E V S V A A T S Y F D N S D A V
 GGGGTCTGCTTAAGCCTGGAACCGGCTTGCTCAGCATTCTGGATGACCAGACCCGGAGAAACCGCAGTGACCTGCAGTTCCTTGAGAGTC 1530
 R G L L K P G N G L L S I L D D Q T R R N R S D L Q F L E S
 TCCGCAAGCGTTTCGAGGGCAAGAACCAGCTATTACCCCGGCTCGGCCAACACCAGACTCCCGGGCAGCAACTTCTATACCGAGAATA 1620
 L R K R F E G K N P A I T P G S A N T R L P G S N F Y T E N
 CGGCCGCTTCTGTCACGGTCAAGCATTTGCCGGTGAAGTTGATTATCCGGTTAAGGGCATCATTGAGGAGAACGGCGAGGTTATTTCTG 1710
 T A A S F T V K H F A G E V D Y P V K G I I E E N G E V I S
 GTGATCTGCTTAACATGATCAACTCCACCAAGAGCGAGTTCGTTGCTAGACTGTTTGGCCAGGAAGCCCTGAAGACTGTCACCCATCCCA 1800
 G D L L N M I N S T K S E F V A R L F G Q E A L K T V T H P
 AGGAGCGTTCGACCGTATGACGCGACCAATTAGCTCCAAGCCACGAGAGCGCCAGTGTATGCTCTCGGAAGACCACCAGGACGGCTC 1890
 K E R S T V M Q A T I S S K P T R A P S V M S R K T T R T A
 GTAACCAACGTAGGATTCAGCAATACCATCAGCAGCAGGACGAGGCTTCTCAGGACGAGCTCGACAGAGTCAAGGAGGGCAACTCACAGT 1980
 R N Q R R I Q Q Y H Q Q Q D E A S Q D E L D R V S E G N S Q
 CCGGTAGTGTTCGAAGCTGCAAGCCTCCGAGCAGGGCGGTCAGGTCAGTTCCTCGCTCTCTGGACAACGTTACCAAGTCTGTGGCGG 2070
 S G S V S K L Q A S E Q G A S G Q F L A S L D N V T K S V A
 ACCCGAGCACAACCTCGTACTTTGTGTTTTGCTTGAACCCCAACGACAGCAGCATCGCAACCAGTTCGACAGCAAGTGGTACGACCC 2160
 D P S T N S Y F V F C L K P N D R R I A N Q F D S K C V R T
 AAGTGCAAATTTCCGGTATTGCCGAGATAAGCCAGCGTCTGCGTTAGCCGACTTCAGTCTTTTCTACCCTTTGGCGAGTTTTTGGGTC 2250
 Q V Q T F G I A E I S Q R L R S A D F S L F L P F G E F L G
 TCGCTGACTCGGATACGATCCTGGTCGACGAGCGAGAACGCGTTGAGCTCGTTGTCGAAGACAAGCACTGGCCTAGCAATGAGGTCA 2340
 L A D S D T I L V G T E R E R V E L V V E D K H W P S N E V
 GAATTGGCTCGACTGGTGTCTCCTCAGCGAACGGTGCTGGATGGAGATTGCCAGCTGTCCGACAGCGCATCTGCCACTGGACGCTATA 2430
 R I G S T G V F L S E R C W M E I A Q L S D S A S A T G R Y

ACCTGCCGTCTGATGCTGGTGACGGCCTCACCCCCAGGACACCCCTTCGCCGCTCCAAGGAGCGCCTGCTCTCCGCCGCAATACCC 2520
N L P S D A G D G L T P Q D T P F A A S K E R L L S A G N T

CCCTCATGTACGGCGAGAAGGGCAAGAACGGCTACTTTGGTCCGGATGGCTCCGACGCTCGCTCAGAAGCCGGTGTGTCGGCGTTTGGTG 2610
P L M Y G E K G K N G Y F G P D G S D A R S E A G V S A F G

GTGGCGACATGTTCAAGAACCTTGACACCAGAGAACAGATGGCGGAGCGGGCAATGAGAAGAGCTTGGAGGAAGTCGAGGAGTTCAAGG 2700
G G D M F K N L D T R E Q M A E R G N E K S L E E V E E F K

ACAGTCTAGCCGTAAGCGCTGGGTCTTCATGGTCTACGTTATGACATGGTTTGGTCCGGACATTCTCATTTCGCAAGATGGGCCGATGC 2790
D S P S R K R W V F M V Y V M T W F V P D I L I R K M G R M

CTCGCAAGGATATTCGCGTGGCTGGAGAGAGAAGCTCGCCATCAACATGATGATCTGGCTGTTCTGTCTATTTCGCGCCTTCTTCATCG 2880
P R K D I R V A W R E K L A I N M M I W L F C L F A A F F I

TCATCTTCCCGAAGCTCATTGTCCACGCAACACGTCTACAGTCCGAGGAGTGTGTCGTCGAACGACGGCAAGGGCTCTGACCCTGCCT 2970
V I F P K L I C P T Q H V Y S A E E L S S N D G K G S D P A

ACGTTGCGATCCGCGGTGTTGTCATCGACTTGGGCTCGTTCGCTCCTCGCCACTACCTCCTTACGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGAATT 3060
Y V A I R G V V I D L G S F A P R H Y P P Y V T V K Q L K N

ACGCCGCAAGGATATTAGTGCCTGTTCCCAATTCAGGTCAGCGCTCTTTGCCAGGGCAAGGATGGCTCCGTTGACCCTCACGTCACAC 3150
Y A G K D I S A L F P I Q V S A L C Q G K D G S V D P H V T

TGGACTACCGTAACACCAACCTCACGGGCTCTGCACAGCTGGCATCAATCGACCTGAACCTTCAAATATCATGACTTCCGCTACTTTACCA 3240
L D Y R N T N L T G S A Q L A S I D L N F K Y H D F R Y F T

ATGATAGCCGACCCGACTGGTACTTCGAGCAAATGACGATGCTCAAGAATTATACCTGAAGGGCGCCGTCGGCTACTCGCCGACGATG 3330
N D S R P D W Y F E Q M T M L K N L Y L K G A V G Y S P Q Y

TCAAGACGCTCGCCAACAAGCAGCAGAACATTCTTATTTGGGTGGCCGCGTTTACGACATGACACAGTACTTGGCCGGTGGTAACAAGA 3420
V K T L A N K Q Q N I L I L G G R V Y D M T Q Y L A G G N K

TGCAGGCCAAGGCCGGCGAGTCACTTCCGACGATCAGTCTTGTCCAGGTTTCATGGATAGCTCGGTGCAAGCTCTGTTCCAGGGCAAGG 3510
M Q A K A G E S V P D D Q S L S R F M D S S V E A L F Q G K

CGGGCACTGATATCACGGAGCTGTGGGATAACCTCGCTATGGATCCTGCCTGAAGCAGCGCATGAAGGTGTGTCTCGACAACCTCTTTT 3600
A G T D I T E L W D N L A M D P A L K Q R M K V C L D N L F

ATGTCCGCGACGTCGACACCGTAACCTCGGCCGCTGTGAGTTTCCGAGTACCTTGTCTTGTCTTCCATCATCCTGTGTTCCATTC 3690
Y V G D V D T R N S A R C Q F A E Y L V L V V S I I L C S I

TCGGCTTCAAATCTTGGCCGCTGCAGTTTGGGGTAAAGAATGCCTGAGAACCCTTGACAAGTTCGTCATGTGTCAAATCCCGCAT 3780
L G F K F L A A L Q F G G K N M P E N L D K F V M C Q I P A

ATACGGAAGATGAGGAGTCTCTCCGCCGTGCTATCGACTCTGCCGCTAGGATGCACTACGACGATAAACGCAAGTACTTGTGTTATCT 3870
Y T E D E E S L R R A I D S A A R M H Y D D K R K L L V V I

GCGACGGCATGATTATTGGACAAGGCAACGACAAACACCTCGCATTGTGCTCGACATTCTCGGCGTCTCTGACACTGTTGATCCCG 3960
C D G M I I G Q G N D K P T P R I V L D I L G V S D T V D P

AGCCTCTCAGCTTCAATCACTCGGTGAAGGTCAGAAACAGCACAATATGGGCAAGGTGTAAGTCCGGCCTCTACGAGGTCAGGGCCACA 4050
E P L S F E S L G E G Q K Q H N M G K V Y S G L Y E V Q G H

TCGTGCCATTCTTGTGTTGTCAAGATCGGCAAAACCGTCCGAGGTGTCCCGTCCCGGCAACCGTGGAAAGCGTGAATCTCAAATGATCA 4140
I V P F L V V V K I G K P S E V S R P G N R G K R D S Q M I

TCATGCGCTTCTCAACCGCTGCACTACAATCTGCCATGAGCCCTCTCGAGCTCGAGATCTATCATCAAATCCGCAACATCATCGGTG 4230
I M R F L N R V H Y N L P M S P L E L E I Y H Q I R N I I G

TCAATCCACCTTTTACGAATTCATGTTTCAGATCGATGCCGATACTGTGCTGCTCCTGACTCCGCCACACGATGGTATCCGCGTTCC 4320
V N P T F Y E F M F Q I D A D T V V A P D S A T R M V S A F

TATATGATACCCGTCTCATTGCCGTGTGCGGTGAGACGGCGCTGACCAACGCCAAGGCATCGTTCATCAGATGATTGAGGTGTATGAGT 4410
L Y D T R L I A V C G E T A L T N A K A S F I T M I Q V Y E

ACTGGATCTCCACAACCTTAACCAAGGCTTTTCGAGAGTCTGTTCCGACGCGTAACCTGCTTGCCTGGTTGTTTCTCAATGTACCGCATTC 4500
Y W I S H N L T K A F E S L F G S V T C L P G C F S M Y R I

GCGCCGCGAGAGTGGAAAGCCCTTTTCGTCAGTCGCGAGGTTGTTGAGGCCTACGCGACGATCCGTGTAGATACTCTGCACATGAAGA 4590
R A A E S G K P L F V S R E V V E A Y A T I R V D T L H M K

ACCTGCTCCACCTGGGTGAGGATCGATACCTGACGACACTGCTTCTCAAGTTCACAACAAGTACAAGACCAAGTACACCAACAGAGCGC 4680
N L L H L G E D R Y L T T L L L K F H N K Y K T K Y T N R A

ACGCTGGACCATTCACCCGACTCTTGGCCGCTTCTCTCGCAGAGACGTCGCTGGATCAACTCGACCGTGCACAACCTCATGGAGC 4770
H A W T I A P D S W A V F L S Q R R R W I N S T V H N L M E

TTATTCATGTCAGCTTTTGGCTTCTGTTGCTTCTATGCGTTTCATGCTTTTTCGACCTTGTGTCACAATCGTACAACCTG 4860
L I P M S Q L C G F C C F S M R F I V F V D L L S T I V Q P

TCGTTGTGGCCTATATCATCTACCTGATCGTTATGGTCGTGCAGAACCCTACTGTTGTGCCCGTCGCGGCCCTTCGTTATGCTTGGCGCCA 4950
V V V A Y I I Y L I V M V V Q N P T V V P V A A F V M L G A

TCTACGGTCTGCAAGCCATCATCTTCATCCTCCGCCGAAGTGGGAGATGATTGGCTGGATGATTCTATACATCGTGGCCATCCCCGTCT 5040
I Y G L Q A I I F I L R R K W E M I G W M I L Y I V A I P V

TTAGTTTCGCTCTGCCGTGTA CTCTGGCACATGGACGACTTCAACTGGGGTAACACCCGTGTTATTGCCGGCGAGGCCGGTAAGA 5130
F S F A L P L Y S F W H M D D F N W G N T R V I A G E A G K

AGATTGTCATATCCGACGAGGGTAAATTCGACCCCTCCGTCATTCCCAAGAAGAAGTGGGAGGAATACCAGGCCGAGCTCTGGGACGCC 5220
K I V I S D E G K F D P S V I P K K K W E E Y Q A E L W D A

AGACGAACAAGGAGGACGCTCGCTCCGAGGCTTCTGGTATAGCTACGCCACCAAGGGCCAGGTTCCCATGTCTGAGTACGGCTACCACA 5310
Q T N K E D A R S E A S G Y S Y A T K G Q V P M S E Y G Y H

GCCGTCGGGTTCCATCGCAGGCGGCTACGCGCCCCCTAGAGCCCCGGGATGGGCTATGACCAACGCAACATGTACGCATGTCCCTTG 5400
S R P G S I A G G Y A P P R A P G M G Y D Q R N M S R M S L

CCGCCTCGGAGATGGGTGGCAACCGCAACAGCCAGTTTGGCGGTTGCGAGTCTTCTCCCCGAGGACATGGTGGGCTGCCTAGTGACG 5490
A A S E M G G N R N S Q F G G S Q F F S P E D M V G L P S D

ACGCGCTATTGGCCGAGATCCGCGAGATTCTGCGGACTGCCGATTTGATGACGGTGACGAAGAAGGGCATTAAAGCAGGAGCTCGAACGTC 5580
D A L L A E I R E I L R T A D L M T V T K K G I K Q E L E R

GTTTCGGTGTTCCTCTCGATGCCAAGCGCAACATATCAACAGCGGatagctctttgtgtctttacaggactgttttgtttactaaccttg 5670
R F G V P L D A K R Q H I N S Intron 2

ccatttagCAACGGAAGCGCTGTCTGGCCAATTGTAAgccccaaagcggttggtgattctataactaatttaatgcattgttcactct 5760
A T E A L L S G Q L .

ggattatggggacatcaaaaagggttcatttgcgacgcttggtttgtggttttcaaatgagtcaggggaagcatatttcttctgtaaat 5850
acagtggtatctatcataataatggatgaaagtagccggatgagagtagaccagtcagttctcgcggttgctgtgtattatTTTTTTCG 5940
tgcaccataatcaacctgtatggctgggatgagattttgtcgtcacaagttcggggcgagtagagacgaatagaccgagagtttgtctt 6030
tataagtaacaaccggcacatgaaccacagtggtttggatgcttcacagcttggtgctgacggctgcgacctcctggtcggagcgtaaga 6120
tgtccggcagcggcccgacgggagtgacagaaaaggggttgatctgctgctggtcttgggtgtagtgccacttgatattgctcaaaactgcg 6210
tcgtgtccttgaaagctggcagcttccagtagcaggttgccatccacttgggatgtaggggtaccggagcggatgtcgcggatgttgc 6300
atttaaagtgtgacagtagacgggcttgagaaagggggtgattgttagcttccctcccggtgagatttgaaaggggagacacacaca 6390
tcgaaacggatgattgtagcaaaagctagggcaagtcggttaagcattcttaatacaagctt 6451

VII.4.4 *ChsD*

Von *ChsD* ist nur die Sequenz zwischen den Primern CHS4 und CHS5 bekannt. Hinsichtlich der Markierungen gilt dasselbe wie bei den anderen Genen.

CHS4 –

AAGCCGGGAATAGGGGAAGCGTGACTCCAAATTCGTTGATGAGCTTCTCAACCGAGTCCACCACAGAGCTCCTATGAGCCCACT 90
K P G N R G K R D S Q I L L M S F L N R V H H R A P M S P L

GAGTTGGAATGTTCCACCAGATCAACAATATTATCGGCGTGGATCCCGAGCTGTACGAATATTTGATGATGGTTCGACGCCGATACGTGT 180
E L E M F H Q I N N I I G V D P E L Y E Y L M M V D A D T C

GTCGGGAAGACTCGCTCAACAGACTGGTTTCAGCATGTGCCAATGATGCTAAAATTGCTGGTATTTGTGGCGAGACGGGTCTGCAGAAC 270
V R E D S L N R L V S A C A N D A K I A G I C G E T G L Q N

GACGACAAATCCTGGTGGACCATGATCCAGGTCTACGAGTATTTCAATTCACACAACCTGGCCAAGGCCCTTCAATCTCTTTGGCAGT 360
D D K S W W T M I Q V Y E Y F I S H N L A K A F E S L F G S

GTCACCTGCTTGCTGGATGgtaagcgtatcttgacgatctccctgtacagcgtcagtcagcgaatatttccagTTTCACCATGTATCGC 450
V T C L P G C Intron F T M Y R

TTGCGTACCGTCGACAAAGGCAAGCCGCTGATTATCGCCGATGGCGTTATCCGTGACTACGCTGTGTGCGACGTTGACACTCTCCACAAG 540
L R T V D K G K P L I I A D G V I R D Y A V C D V D T L H K

AAGAACCTGCTGTCACTCGGTGAGGATCGGTACCTGACCACCCCTCATGACCAAGTACTTCCCGTCTATGAAGTACAAATTCATCCCGAT 630
K N L L S L G E D R Y L T T L M T K Y F P S M K Y K F I P D

GCCTACTGTCAAACCGCGCACCCGAGTCTGGAGCGTCTGCTTTCCAGCGTCTGCTTGGATTAACCTCCA 703
A Y C Q T A A P E S W S V L L S Q R R R W I N S

– CHS5

VII.5 Abkürzungsverzeichnis

Alle benutzten Maßeinheiten folgen dem internationalen SI-System und werden deshalb hier nicht gesondert aufgeführt.

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ac	Acervulus
AP	Alkalische Phosphatase
Ap	Appressorium
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
cfu	<i>colony forming units</i>
Chs/CHS	Chitin Synthase/Synthase
CM	Komplettmedium
Csm	Chitin Synthase mit Myosin-artiger Domäne
CSPD	Dinatriummethoxyspirotricyclophenylphosphat
C-terminal	Carboxyterminal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DIG-dUTP	DIG-desoxyUridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxyNukleotidtriphosphat
dATP	desoxyAdenosintriphosphat
dCTP	desoxyCytidintriphosphat
dGTP	desoxyGuanosintriphosphat
dTTP	desoxyThymidintriphosphat
d p.i.	Tage nach Inokulation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
Hp	Hyphopodium
Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalacto-pyranosid
kDa	kiloDalton
kb	kiloBasenpaare
ko	<i>knock-out</i>

MAP Kinase	<i>mitogen activated protein Kinase</i>
MOPS	3-(Morpholino-)propan-sulfonsäure
N-terminal	Aminoterminal
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG 4000	Polyethylenglykol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4000 g mol ⁻¹
pHy	primäre Infektionshyph
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR (s.o.) mit vorhergehender reverser Transkription
SDS	Natrium Dodecylsulfat
sHy	sekundäre Infektionshyph
Sp	Spore
TG	Trockengewicht
TSR-Puffer	<i>template suppression reagent</i>
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-GlcNAc (s.o.)
VSC	<i>vesicle supply center</i>
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galacto-pyranosid

VII.6 Anmerkungen zur Schreibweise

Fremdsprachige Fachbegriffe wurden weitestgehend ins Deutsche übersetzt. In Fällen, in denen dies nicht möglich oder sinnvoll erschien, wurden die Originalbegriffe in Kursivschrift verwendet.

Bezeichnungen für Gene sind groß und kursiv geschrieben (z.B. *ChsA*). Falls aus dem Kontext nicht eindeutig ersichtlich, wurde noch der abgekürzte Artnamen vorangestellt (z.B. *CgChsA*). Die dazugehörigen Proteine sind groß und nicht-kursiv geschrieben (z.B. ChsA bzw. CgChsA). Mutationen, die zu einem Gendefekt führen, werden durch ein Δ und kleine Anfangsbuchstaben verdeutlicht (z.B. $\Delta chsA$).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 6. Juni 2002

Lebenslauf

1. PERSÖNLICHE DATEN

Name: Stefan Werner
geboren: 24. Oktober 1971 in Pforzheim
Familienstand: verheiratet, 2 Töchter

2. AUSBILDUNG

1978 – 1982 Karl-Friedrich-Grundschule Pforzheim
1982 – 1991 Reuchlin-Gymnasium Pforzheim

1991 – 1992 Zivildienst bei der Behinderteninitiative Pforzheim e.V.

WS 1992 – SS 1996 Studium der Biologie an der Universität Konstanz
11/1996 – 10/1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie der Universität
Konstanz
Thema: Biochemische Untersuchungen an Chitin Deacetylase
des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* (Teleomorph:
Glomerella graminicola)

3. PROMOTION

01/1997 – 09/2001 Doktorand am Institut für Pflanzenzüchtung und
Pflanzenschutz, Bereich Phytopathologie und Pflanzenschutz
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

4. BERUF

10/2001 – Research Scientist bei Icon Genetics GmbH, Halle