

# Pathogene Differenzierung von *Botrytis cinerea* – Molekulare Grundlagen und Rolle des VELVET-Komplexes

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung  
des akademischen Grades *Doktor der Naturwissenschaften* genehmigte

## Dissertation

M. Sc. Nathalie Müller

Wissenschaftliche Aussprache: Kaiserslautern, 19.12.2017

Vorsitzender der Promotionskommission:

Herr Prof. Dr. Sandro Keller

Betreuer: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Ekkehard Neuhaus

**Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht oder sind eingereicht/ in Vorbereitung:**

Leroch M., **Mueller N.**, Hinsenkamp I. und Hahn M. (2015). The signalling mucin Msb2 regulates surface sensing and host penetration via BMP1 MAP kinase signalling in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 16:787-798.

**Müller N.**, Leroch M., Schumacher J., Zimmer D., Könnel A., Klug K., Sommer F., Mühlhaus T., Schroda M., Hahn M. Analyses of VELVET regulatory mutants support a role of host tissue acidification and secretion of proteins in pathogenesis of *Botrytis cinerea*. Eingereicht bei *New Phytologist*.

**Müller N.**, Leroch M., Hahn M. Structural interactions in the *B. cinerea* BMP1 MAP kinase cascade and functional analysis of BMP1-regulated genes. In Vorbereitung.

**Müller N.**, Leroch M., Hahn M. *Botrytis cinerea* Sho1 affects hyphal differentiation and influences lesion development in an interplay with Msb2. In Vorbereitung.

Wohin du auch gehst, geh mit deinem ganzen Herzen.

*Konfuzius*

Der Mensch hat dreierlei Wege, klug zu handeln:  
Erstens durch Nachdenken – das ist der edelste  
zweitens durch Nachahmen – das ist der leichteste  
und drittens durch Erfahrung – das ist der bitterste.

*Konfuzius*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
3.1 Der Graufäulepilz <i>Botrytis cinerea</i> .....	5
3.1.1 Virulenz-assoziierte Proteine und andere Virulenzfaktoren.....	6
3.1.2 Rolle der externen Ansäuerung und organischer Säuren in der Pathogenese .....	7
3.1.3 Das Sekretom von <i>B. cinerea</i> .....	8
3.2 Mechanismen der Signaltransduktion pathogener Pilze.....	11
3.2.1 MAPK-Kaskaden in <i>B. cinerea</i> .....	12
3.2.1.1 Die Sensorproteine Msb2 und Sho1 .....	13
3.2.2 Der VELVET-Komplex .....	14
3.2.2.1 Die Rolle des VELVET-Komplexes in <i>B. cinerea</i> .....	15
3.3 <i>Botrytis fabae</i> .....	17
3.4 Zielsetzung .....	19
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
4.1 Die Funktion der Sensorproteine Sho1 und Msb2.....	20
4.1.1 Erstellung von <i>sho1</i> und <i>msb2/sho1</i> Mutanten .....	20
4.1.2 Sho1 beeinflusst Oberflächenerkennung, Hyphendifferenzierung und vegetatives Wachstum .....	20
4.1.3 Die <i>sho1</i> Mutante zeigt keine Virulenzdefekte .....	22
4.1.4 Sho1 hat weniger Einfluss auf die BMP1-Aktivierung als Msb2.....	23
4.1.5 Y2H-Interaktionen der <i>B. cinerea</i> Sensorproteine Msb2 und Sho1 .....	24
4.1.5.1 Screening einer cDNA-Bibliothek auf Msb2-Interaktionspartner.....	25
4.2 Funktionelle Analyse keimungs- und BMP1-regulierter Gene .....	26
4.3 Charakterisierung und vergleichende Analysen von <i>B. cinerea</i> VELVET-Mutanten .....	31
4.3.1 Erstellung verschiedener VELVET-Mutanten .....	31
4.3.1.1 Die <i>vel1*</i> Mutation verursacht einen VELVET-typischen Phänotyp.....	31
4.3.1.1 Komplementation der <i>vel2</i> Mutante.....	33
4.3.2 Die Lokalisierung der VELVET-Proteine ist unabhängig von VEL2, VEL1* zeigt eine Kernlokalisierung .....	33
4.3.3 Der VELVET-Komplex beeinflusst vegetatives Wachstum und lichtabhängige Differenzierung.....	34
4.3.4 Die Läsionsausbreitung ist in VELVET-Mutanten stark reduziert.....	35
4.3.5 VELVET-Mutanten zeigen eine veränderte pH-Modulation und Sekretion organischer Säuren.....	36
4.3.5.1 Die Rolle von <i>oahA</i> und Oxalat während der Infektion .....	38
4.3.6 Einfluss der externen Ansäuerung und der Nährstoffverfügbarkeit.....	40
4.3.7 Vergleichende <i>in planta</i> Transkriptom-Analysen von VELVET-Mutanten .....	43
4.3.8 Quantitative Sekretomanalysen korrelieren stark mit dem mRNA-Level .....	47
4.3.8.1 Das <i>B. cinerea on planta</i> Sekretom.....	47

## Inhaltsverzeichnis

4.3.8.2	<sup>15</sup> N-Quantifizierung differenziell sekretierter Proteine .....	48
4.4	Vergleiche des Infektionsverhaltens von <i>B. fabae</i> und <i>B. cinerea</i> .....	51
4.4.1	<i>B. fabae</i> kann Ackerbohne bei hohem pH erfolgreich infizieren .....	51
4.4.2	Der Infektionsdefekt der VELVET-Mutanten ist auf Ackerbohne schwächer ausgeprägt als auf Tomate .....	52
4.4.3	Das <i>B. fabae</i> Transkriptom: Differenzielle Genexpression während der Infektion von ..... <i>V. faba</i> .....	53
4.4.4	Qualitative Vergleiche der <i>B. cinerea</i> und <i>B. fabae</i> Sekretome auf Tomate und Ackerbohne .....	55
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>58</b>
5.1	Identifizierung neuer Komponenten des BMP1-MAPK-Signalwegs .....	58
5.2	Lokalisierung und Interaktion von Proteinen des VELVET-Komplexes.....	62
5.3	Phänotypische Vergleiche zeigen deutliche Unterschiede zwischen VELVET-Mutanten ...	63
5.4	Der VELVET-Komplex reguliert auf transkriptioneller Ebene die Sekretion Virulenz-assoziiertes Proteine .....	66
5.5	Hinweise auf die Ursachen der Wirtsspezifität von <i>B. fabae</i> .....	68
<b>6.</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>72</b>
6.1	Chemikalien, Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterial .....	72
6.2	Verwendete Mikroorganismen .....	77
6.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	77
6.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	78
6.2.3	<i>B. cinerea</i> und <i>B. fabae</i> .....	79
6.3	Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen.....	80
6.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	80
6.3.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	80
6.3.3	Kultivierung von Pflanzen für Standard-Infektionstests .....	80
6.3.4	Kultivierung von <i>Botrytis</i> Stämmen.....	81
6.4	Molekularbiologische Methoden.....	81
6.4.1	Verwendete Oligonukleotide.....	81
6.4.2	Verwendete Plasmide .....	85
6.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	86
6.4.4	Isolierung genomischer DNA aus <i>Botrytis</i> .....	86
6.4.5	Sequenzierungen.....	87
6.5	Klonierung von Konstrukten zur Mutagenese von <i>B. cinerea</i> .....	87
6.5.1	Erstellung von <i>B. cinerea</i> Deletionsmutanten.....	87
6.5.2	Die <i>msb2/sho1</i> Doppeldeletion.....	89
6.5.3	Komplementation von Mutationen .....	89
6.5.4	Erstellung von Mutanten mit GFP-Fusionsproteinen.....	90
6.6	Transformation der Mikroorganismen .....	90
6.6.1	Transformation von <i>B. cinerea</i> .....	90
6.6.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	91
6.6.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	91
6.7	Allgemeine phänotypische Analysen .....	91
6.7.1	Keimungstests, Hyphendifferenzierung und Penetration .....	91

## Inhaltsverzeichnis

6.7.2	Fluoreszenzmikroskopische Analysen.....	92
6.7.3	Analysen des Wachstums und der lichtabhängigen Differenzierung .....	92
6.7.4	Analyse der pH-Wert-Änderung durch <i>B. cinerea</i> und Messung sekretierter organischer Säuren.....	93
6.7.5	Infektionstests, pH-Manipulation während der Infektion und DAB-Färbung.....	93
6.8	Sekretom-Analyse .....	94
6.8.1	Herstellung von <i>Botrytis</i> -Exudaten .....	94
6.8.2	Messung der Proteaseaktivität in <i>Botrytis</i> -Exudaten .....	94
6.8.3	Vorbereitung der Proben für die Massenspektroskopie (MS/MS) .....	94
6.8.4	Qualitative und Quantitative MS/MS-Proteomanalysen .....	95
6.9	Genexpressionsanalysen.....	96
6.9.1	RNA-Extraktion .....	96
6.9.2	qRT-PCR .....	96
6.9.3	RNAseq Analysen.....	96
6.9.3.1	Alignments und Berechnung statistisch signifikanter Expressionsänderungen.....	96
6.9.3.2	Funktionelle Klassifizierung und Erstellen einer RNAseq-Auswertungstabelle .....	97
6.9.3.3	DESeq Genexpressionsanalyse.....	98
6.10	Yeast two-hybrid Protein-Interaktionsstudien .....	98
6.11	BMP1-Phosphorylierungsstudie.....	98
6.12	Statistische Analysen .....	99
6.13	Datenverarbeitung und bioinformatische Software.....	99
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>110</b>
8.1	Abbildungen .....	110
8.2	Tabellen.....	119
8.3	Zusätzliche digitale Tabellen.....	120
8.3.1	RNAseq-Tabelle_final_NM_Dissertation .....	120
8.3.2	Sekretomtabelle_final_NM_Dissertation.....	120
8.4	Methoden .....	121
8.4.1	Quantitative proteome analysis by <sup>15</sup> N metabolic labeling .....	121
8.4.2	Analysis of transcriptome and proteome data correlation .....	121
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
	<b>Lebenslauf Nathalie Müller .....</b>	<b>124</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>125</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>126</b>

## 1. Zusammenfassung

*Botrytis cinerea*, der Erreger der Graufäule, infiziert hunderte verschiedene Pflanzenspezies und verursacht weltweit enorme landwirtschaftliche Verluste. Dabei tötet er das Wirtsgewebe sehr schnell mithilfe lytischer Enzyme und Nekrose-induzierender Metaboliten und Proteine ab. Das Signal-Mucin Msb2 ist in *B. cinerea*, wie in anderen pathogenen Pilzen, wichtig für die Oberflächenerkennung, Differenzierung von Appressorien und die Penetration des Pflanzengewebes. Msb2 agiert oberhalb der BMP1 Pathogenitäts-MAPK-Kaskade. In dieser Studie konnte eine direkte Interaktion zwischen Msb2 und BMP1, sowie zwischen den beiden Sensorproteinen Msb2 und Sho1 nachgewiesen werden. Dennoch führte die Deletion von *sho1* lediglich zu geringfügigen Defekten im Wachstum, der Hyphendifferenzierung und der Bildung von Infektionsstrukturen. Sho1 zeigte nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung von BMP1. Das Fehlen von Sho1 verursachte keine Virulenzdefekte, während der Doppel-KO von *msb2* und *sho1* zu einer stärkeren Reduzierung der Läsionsausbreitung im Vergleich zu *msb2* Mutanten führte. Es wurden mehrere keimungsregulierte, BMP1-abhängige Gene deletiert und die Mutanten phänotypisch charakterisiert. Keines der Gene für lytische Enzyme oder putative Effektorproteine beeinflusste die Virulenz. Mutanten, denen das für ein Ankyrin-repeat Protein codierende *arp1* Gen fehlt, zeigten eine gestörte Oberflächenerkennung, gravierende Wachstumsdefekte und reduzierte Virulenz.

*B. cinerea* VELVET-Mutanten sind in der lichtabhängigen Differenzierung und der Ausbreitung nekrotischer Läsionen beeinträchtigt. In dieser Arbeit ermöglichte die Charakterisierung mehrerer Mutanten ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge, aufgrund derer der VELVET-Komplex die Entwicklung und Pathogenese in *B. cinerea* reguliert. Quantitative Vergleiche der *in planta* Transkriptome und Sekretome führten zur Identifizierung eines für drei VELVET-Mutanten gemeinsamen Sets an herunterregulierten Genen, welche für CAZymes, Proteasen und Virulenz-assoziierte Proteine codieren. Die meisten dieser Gene wurden zusätzlich im Wildtyp während der Infektion verstärkt exprimiert, was zusätzliche Hinweise auf deren Relevanz im Infektionsprozess lieferte. Die drastisch verringerte Expression von Genen für Proteasen konnte mit niedrigerer Proteaseaktivität und der unvollständigen Mazeration des Gewebes an der Infektionsstelle in Verbindung gebracht werden. Der neu etablierte quantitative Sekretom-Vergleich des Wildtyps und der VELVET-Mutanten mithilfe <sup>15</sup>N-markierter Proteine korrelierte eindeutig mit den Transkriptomdaten sekretierter Proteine. Damit wurde gezeigt, dass die Abundanz der Proteine maßgeblich von deren mRNA-Level abhängt. Die Unfähigkeit zur Ansäuerung des Wirtsgewebes ist einer der interessantesten phänotypischen Aspekte der VELVET-Mutanten. Während Citrat die dominierende von *B. cinerea* ausgeschiedene Säure ist, sekretierten VELVET-Mutanten deutlich weniger Citrat. Weder für Oxalat noch für Gluconat konnte eine wichtige Rolle während der Infektion bestätigt werden. Die Läsionsausbreitung der Mutanten

## Zusammenfassung

wurde sowohl durch Zugabe von Vollmedium, als auch durch künstlich konstant niedrig eingestellte pH-Werte an den Infektionsstellen gefördert, während die Einstellung auf neutrale pH-Werte die Expansion beim *B. cinerea* Wildtyp stark beeinträchtigte. Damit ist die Ansäuerung in Tomatenblättern ein wichtiger Virulenzmechanismus, der möglicherweise essentiell für die Aktivität der sekretierten Proteine ist.

Überraschenderweise scheint eine Ansäuerung des Gewebes für die erfolgreiche Infektion der Ackerbohne *Vicia faba* nicht notwendig zu sein. Weder *B. cinerea* noch der am nächsten verwandte *Botrytis fabae*, welcher sich als Spezialist auf *V. faba* aggressiver verhält, zeigten während der erfolgreichen Infektion eine Ansäuerung des Ackerbohnenblattgewebes. *B. fabae* ist auf wenige Wirtspflanzen der Fabaceae begrenzt. Die Grundlagen der Wirtsspezifität sind bisher unklar. Vergleichende Transkriptom- und Sekretom-Analysen ergaben Hinweise für die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Wirtsspektren von *B. cinerea* und *B. fabae*. In dieser Arbeit konnte die schlechte Infektion durch *B. fabae* auf Tomatenblättern mit einer deutlich niedrigeren Proteaseaktivität in Verbindung gebracht werden, während artifiziell konstant niedrige pH-Werte die Läsionsausbreitung kaum förderten. Im Gegensatz zur Infektion von Tomatenblättern wurden jedoch auf *V. faba* insgesamt deutlich niedrigere Proteaseaktivitäten in den Sekretomen beider Spezies gemessen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die beiden Spezies nicht nur generell unterschiedliche Infektionsstrategien anwenden, sondern dass die Virulenzmechanismen zusätzlich vom infizierten Pflanzengewebe abhängig sind.



## 2. Summary

*Botrytis cinerea* is a necrotrophic plant pathogen able to infect many hundreds of plant species. It kills host tissue rapidly by secretion of lytic enzymes and necrosis-inducing metabolites and proteins. The sensory mucin Msb2 in *B. cinerea*, like in other pathogenic fungi, is important for hard surface sensing, appressoria differentiation and penetration of plant tissue by acting upstream of the pathogenicity related MAPK cascade BMP1. In this study an interaction between Msb2 and BMP1 could be identified, and a physical interaction between the two sensor proteins Msb2 and Sho1 could be shown. Nevertheless, *sho1* deletion mutants revealed only slight defects in growth, hyphal differentiation and formation of infection structures, and revealed a minor role of Sho1 in activation of BMP1. While lack of Sho1 did not result in virulence defects, *msb2/sho1* double mutants showed more strongly reduced lesion expansion compared to the *msb2* mutant. The function of several germination induced and BMP1 regulated genes were investigated by mutant analysis. None of the genes encoding lytic enzymes or putative effector proteins were found to be required for infection. Mutants lacking *arp1*, encoding an ankyrin-repeat containing protein, revealed surface sensing defects and strongly impaired growth and virulence.

*B. cinerea* VELVET mutants show disturbed light dependent development and are impaired in virulence. In this study characterization of several mutants enabled a better understanding how the VELVET complex controls major aspects of pathogenic development. Quantitative comparison of *in planta* fungal transcriptomes defined a common set of genes encoding proteases, carbohydrate-active enzymes and virulence-associated proteins, which were downregulated in three different VELVET mutants. Most of these genes were induced *in planta* in the wild type strain, emphasizing their putative impact on virulence. Drastic downregulation of proteases in the mutants was correlated with lower protease activity and incomplete degradation of host proteins at the infection site. A newly established quantitative comparison of *on planta* secretomes of wild type and VELVET mutants by <sup>15</sup>N-metabolic labelling revealed high correlation with transcriptome data, indicating that protein abundance is strongly determined by mRNA levels. Loss of acidification ability, and instead alkalization of their surroundings, was one of the most interesting phenotypic aspects of VELVET mutants. The mutants produced much lower amounts of citric acid, the dominating organic acid found to be secreted by *B. cinerea*. A major role of oxalic or gluconic acid during infection could not be confirmed. Lesion expansion by the mutants could be stimulated by providing rich medium or maintaining infection sites at acidic pH, whereas constant neutral pH values suppressed expansion of the wild type. These data demonstrate that the ability to acidify tomato leaf tissue is a significant virulence mechanism of *B. cinerea*, possibly by supporting the necrotizing activity of secreted proteins.

## Summary

Surprisingly, acidification of host tissue seems to be dispensable for infection of the broad bean *Vicia faba*. Neither *B. cinerea* nor its closest relative *Botrytis fabae*, which is highly aggressive on broad bean, acidified the tissue during successful infection. *B. fabae* is restricted on a limited set of host plants, all belonging to the Fabaceae. The molecular basis of host-specificity is yet unclear. Comparative transcriptome and secretome analyses of *B. cinerea* and *B. fabae* provided evidences for the molecular basis of their differences in host range. Failure of lesion formation by *B. fabae* on tomato leaves could be correlated with much lower secreted protease activity, while maintaining a low pH did not improve lesion expansion. However, protease activity in secretomes of both species was much lower on broad bean than on tomato leaves. These data indicate dissimilar infection strategies of the two *Botrytis* species, which seem to be additionally modulated by the infected host tissue.

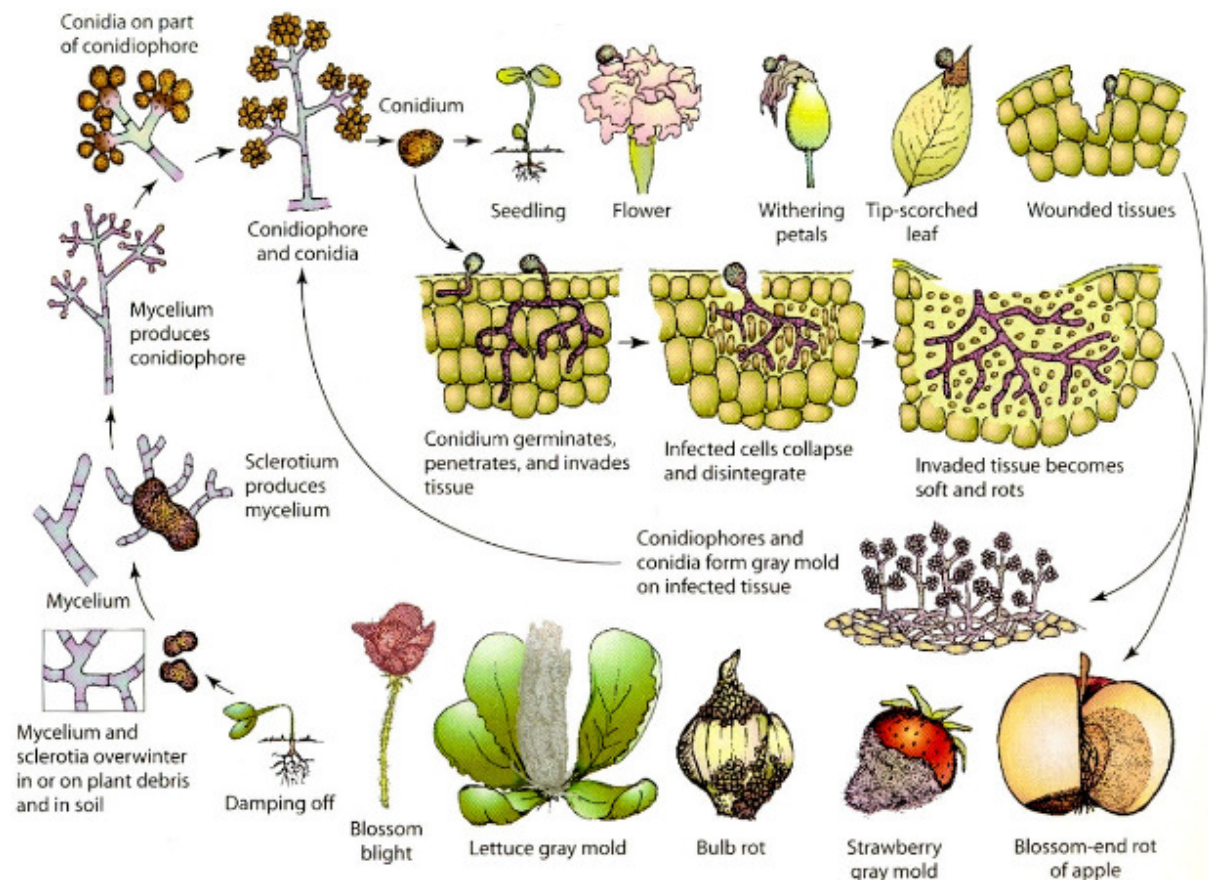
## 3. Einleitung

### 3.1 Der Graufäulepilz *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* ist als Erreger der Graufäule für große landwirtschaftliche Verluste verantwortlich. Dabei verursacht er nicht nur vor, sondern auch nach der Ernte gravierende Ausfälle. Sein Wirtsspektrum umfasst mehr als 1.400 hauptsächlich dikotyledone Pflanzenarten, wie beispielweise viele Obst- und Gemüsesorten, aber auch Zierpflanzen (Dean *et al.*, 2012). Die Fähigkeit zur raschen Entwicklung von Fungizidresistenzen erschwert die Bekämpfung von *B. cinerea* mit chemischen Pflanzenschutzmitteln zunehmend (Hahn, 2014; Rupp *et al.*, 2017). Auch aufgrund seiner hauptsächlich Vermehrung durch massenhaft gebildete asexuelle Sporen, wird *B. cinerea* als eines der ökonomisch bedeutsamsten Pflanzenpathogene weltweit eingestuft (Elad *et al.*, 2016).

Der asexuelle Lebenszyklus von *B. cinerea* ist mit fünf bis acht Tagen von der Sporenkeimung bis zur Bildung neuer mehrkerniger Makrokonidien sehr kurz (Prins *et al.*, 2000). Diese werden an Konidiophoren gebildet und sind namensgebend für die Färbung des Graufäuleerregers verantwortlich (Doss *et al.*, 2003; Webster und Weber, 2007). Konidien werden durch Wind oder Insekten auf neue Wirtspflanzen übertragen und haften mittels schwacher hydrophober Wechselwirkungen an der pflanzlichen Oberfläche, bis es unter geeigneten Bedingungen zur Keimung kommt. Durch Sekretion von Polysacchariden wird eine Adhäsionsmatrix gebildet, welche die Anheftung an die Wirtspflanze verstärkt (Doss *et al.*, 1993; Doss *et al.*, 1995). *B. cinerea* kann durch natürliche Öffnungen und Wunden, oder mittels direkter Penetration in intaktes Pflanzengewebe eindringen. Die Penetration erfolgt in Gegenwart von Nährstoffen durch die Ausbildung morphologisch wenig differenzierter Appressorien oder sogenannter „infection cushions“ (Choquer *et al.*, 2007). Als nekrotropher Schadpilz tötet *B. cinerea* aktiv das Pflanzengewebe ab und ist in der Lage sich fakultativ saprophytisch zu ernähren (Tenberge, 2007). Für die Invasion des Wirtsgewebes sind unter anderem (durch den Pilz sekretierte) lytische Enzyme entscheidend, um die Zellwandbarriere zu überwinden (van Kan *et al.*, 2005). Im Laufe der Infektion werden zunächst Primärläsionen und später großflächige Sekundärläsionen gebildet, aus denen neue Makrokonidien entstehen (ten Have *et al.*, 1998; van Kan, 2006; vgl. Abb. 1). Die zur Konidienbildung alternative Differenzierung von Sklerotien wird in der Natur zwar beobachtet, selten entstehen daraus jedoch Fruchtkörper (Jarvis, 1977). Sklerotien entstehen in Dunkelheit als Überdauerungsformen und können unter günstigen Bedingungen erneut Myzel bilden (Backhouse und Willets, 1984). Durch die Verschmelzung der stark melanisierten Sklerotien mit einkernigen Mikrokonidien entsteht im sexuellen Reproduktionszyklus ein trichterförmiges Apothecium (Fruchtkörper), in welchem sich Asci mit je acht haploiden Ascosporen bilden (Holz *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2007).

## Einleitung



**Abb. 1: Infektionszyklus von *Botrytis cinerea* (Agrios, 2005).**

Asexuelle Konidien keimen aus und infizieren ein breites Spektrum an Wirtspflanzen. Nach wenigen Tagen des invasiven Wachstums und der Mazeration des Pflanzengewebes entstehen Konidiophore, die neue Sporen hervorbringen. Seltener Infektionsformen sind Sklerotien, aus denen ebenfalls neue Hyphen wachsen können.

### 3.1.1 Virulenz-assoziierte Proteine und andere Virulenzfaktoren

Bei Eindringen in die Wirtszelle wird die Hypersensitive Reaktion (HR) induziert (Govrin und Levine, 2000), welche zum pflanzlichen Zelltod führt (Taiz und Zeiger, 2007). Auch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kann die Läsionsausbreitung fördern (Govrin *et al.*, 2006; Shlezinger *et al.*, 2011). Durch eine induzierte Autophagie der Pflanzenzelle kann die Invasion durch nekrotrophe Pathogene jedoch auch gehemmt oder gestoppt werden (Kabbage *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2011). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der wichtigsten bisher für *B. cinerea* beschriebenen molekularen Komponenten, welche Nekrosen oder pflanzliche Abwehrreaktionen induzieren können, oder infektionsrelevant sind. Die Superoxiddismutase Bcsod1 (Rolke *et al.*, 2004) und der Efflux-Transporter BcatrB (Stefanato *et al.*, 2009) gelten als Virulenzfaktoren niedriger Relevanz. Sekretierte lytische Enzyme, die einen geringen Einfluss auf die Virulenz haben sind beispielsweise die Xylanase Xyn11A (Brito *et al.*, 2006; Noda *et al.*, 2010), die  $\beta$ -Glucosidase BcSUN1 (Pérez-Hernández *et al.*, 2017) und die Endopolygalacturonase BcpG2 (Kars *et al.*, 2005). Es konnte lediglich für die Zellwand-abbauende Endopolygalacturonase BcpG1 eine mittlere Relevanz für die Infektion gezeigt werden (ten Have *et al.*, 1998; Kars *et al.*, 2005). Die Toxine

## Einleitung

Botrydial und Botcinin (Dalmais *et al.*, 2011), sowie das Cerato-platanin BcSpl1 (Frías *et al.*, 2011) haben ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die Virulenz. Verschiedene weitere Nekrose-induzierende Proteine (Schouten *et al.*, 2008; Gonzáles *et al.*, 2017) und die lytischen Enzyme BcGs1 (Zhang *et al.*, 2015) und BcXYG1 (Zhu *et al.*, 2017) bewirken eine Schädigung des Wirtsgewebes und induzieren die Pflanzenabwehr, ihr individuelles Fehlen ist jedoch für die Infektion offenbar nicht oder nur von geringer Bedeutung (vgl. Tab. 1). Bislang wurden unter den von *B. cinerea* sekretierten Proteinen keine die Pflanzenabwehr unterdrückenden Effektorproteine identifiziert, wie sie für biotrophe und hemibiotrophe Pilze typisch sind (Lanver *et al.*, 2014). Generell sind nur wenige Effektoren bei nekrotrophen Pathogenen mit breitem Wirtsspektrum beschrieben (Zhu *et al.*, 2017). Insgesamt ist bisher unklar wie *B. cinerea* die pflanzliche Abwehr überwindet und Wirtszellen abtötet.

**Tab. 1: Virulenz assoziierte Proteine und deren Relevanz für die Pathogenese von *B. cinerea*.**

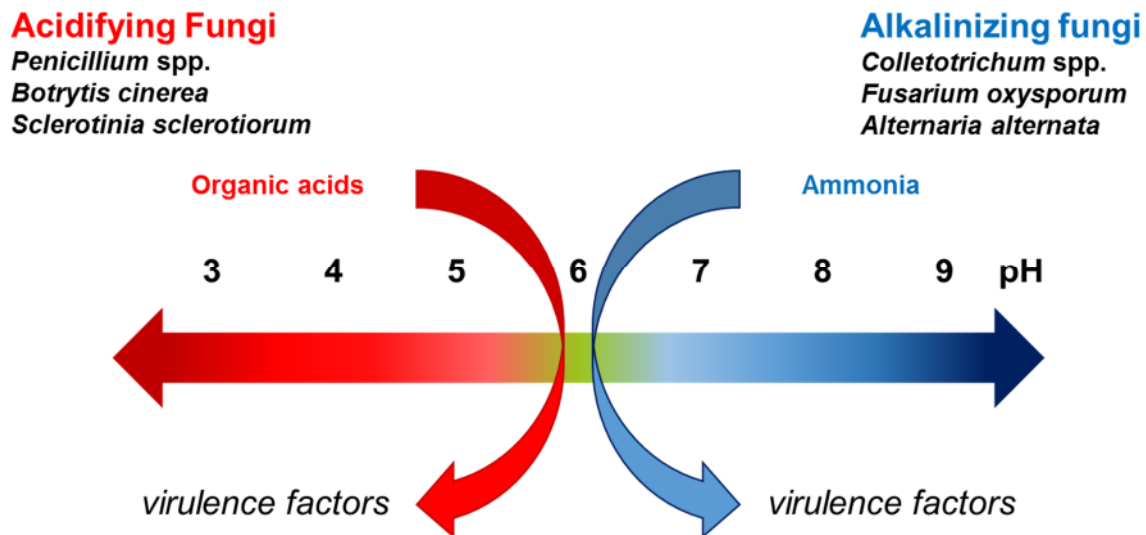
	Relevance for virulence	Induction of necrosis	Induction of plant defense	Reference
<b>Toxins</b>				
Botrydial	low	+	+	Dalmais <i>et al.</i> (2011)
Botcinin	low	+	?	Dalmais <i>et al.</i> (2011)
<b>Necrosis inducing proteins</b>				
Ceratoplatanin-like (BcSpl1)	low	+	+	Frías <i>et al.</i> (2011)
Necrosis-inducing (Bcnep1)	no	+/-	+	Staat <i>et al.</i> (2007), Schouten <i>et al.</i> (2008); Arenas <i>et al.</i> (2010)
Necrosis-inducing (Bcnep2)	no	+/-	+	Staat <i>et al.</i> (2007), Schouten <i>et al.</i> (2008)
BclEB1	no	+	+	Frías <i>et al.</i> (2016); Gonzales <i>et al.</i> (2017)
<b>Lytic enzymes</b>				
Polygalacturonase 1 (Bcpg1)	medium	+	+/-	ten Have <i>et al.</i> (1998), Kars. <i>et al.</i> (2005)
Polygalacturonase 2 (Bcpg2)	low	+	+/-	Kars <i>et al.</i> (2005)
β-1,4 Xylanase (Xyn11A)	low	+	+	Brito <i>et al.</i> (2006), Noda <i>et al.</i> (2010), Nafisi <i>et al.</i> (2014)
α-1,4 Glucanase (BcGs1)	no	+	+	Zhang <i>et al.</i> (2015)
Xyloglucanase (BcXYG1)	no	+	+	Zhu <i>et al.</i> (2017)
β-Glucosidase (BcSUN1)	low	?	+	Pérez-Hernández <i>et al.</i> (2017)
<b>ROS modifying enzyme</b>				
Superoxide dismutase (Bcsod1)	low			Rolke <i>et al.</i> (2004)
<b>Transporter</b>				
ABC Transporter (BcatrB)	low			Stefanato <i>et al.</i> (2009)

### 3.1.2 Rolle der externen Ansäuerung und organischer Säuren in der Pathogenese

Pflanzenpathogene Pilze sind in der Lage den externen pH-Wert aktiv zu modulieren (Manteau *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass eine Einteilung in azidifizierende und alkalisierende Arten erfolgen kann. Während beispielsweise *B. cinerea* und *Sclerotinia sclerotiorum* organische Säuren sekretieren und den Efflux von Protonen zur Ansäuerung nutzen, erhöhen u.a. *Colletotrichum* spp. den externen pH durch das Ausscheiden von Ammonium, um dadurch ein optimales Milieu für Aktivierung und Funktion spezifischer Virulenzfaktoren zu schaffen (Prusky *et al.*, 2013; Alkan *et al.*, 2013; vgl. Abb. 2). Die Modifikation des externen pH-Werts durch *B. cinerea* ist vom Wirtsgewebe abhängig (Billon-Grand *et al.*, 2012). Generell werden bei *B. cinerea* Proteine in Abhängigkeit vom externen pH-Wert sekretiert (Li *et al.*, 2012). Nicht nur die Expression verschiedener Polygalacturonasen, Laccasen oder Proteasen wird durch den pH-Wert

Einleitung

beeinflusst (Espeso *et al.* 2000; Shamraychuk *et al.*, 2014). Bei der Glutamylopeptase BcACP1 ist sowohl die Transkription als auch die post-transkriptionale Maturation des Proteins von einem niedrigen pH-Wert abhängig (Rolland *et al.*, 2008; 2009). Ein Maximum des Sekretionslevels und der Aktivität der Proteasen wurde bei pH 3,1 beobachtet (Manteau *et al.*, 2003; Billon-Grand *et al.*, 2012).



**Abb. 2: Pathogene Pilze modulieren den externen pH zur Aktivierung von Virulenzfaktoren.**

*Penicillium spp.*, *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* sekretieren zur Ansäuerung organische Säuren, während *Colletotrichum spp.*, *Fusarium oxysporum* und *Alternaria alternata* zur Alkalisierung Ammonium sekretieren. Durch die pH-Modulationen werden jeweils spezifische Virulenzfaktoren aktiviert (modifiziert nach Alkan *et al.*, 2013).

Lange Zeit galt Oxalat durch den Einfluss auf die Ansäuerung des Gewebes, den Angriff pflanzlicher Zellwände und die Induktion der HR (Kim *et al.*, 2008) als wesentlich für die Virulenz des zu *B. cinerea* nahe verwandten Weißfäuleerregers *S. sclerotiorum* (Cessna *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2011; Kabbage *et al.*, 2015). Neuere Veröffentlichungen relativierten diese Hypothesen jedoch durch die Analyse Oxalat-defizienter Mutanten, welche nur geringe Defekte in der Pathogenese zeigten (Liang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Die Sekretion von Oxalat durch *B. cinerea* wurde bereits als Virulenzfaktor diskutiert (Manteau *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2013). Einige Studien weisen darauf hin, dass die geringe Menge und der späte Zeitpunkt bei der Bildung von Oxalat eher wenig Einfluss auf die pathogene Entwicklung haben (Verhoeff *et al.*, 1988; Billon-Grand *et al.*, 2012). Andererseits wurde eine apathogene *B. cinerea* Mutante mit unbekanntem Gendefekt beschrieben, die weder Oxalat produzierte, noch das Medium ansäuerte (Kunz *et al.*, 2006). Die Rolle von Oxalat während der Infektion von *B. cinerea* ist daher unklar.

### 3.1.3 Das Sekretom von *B. cinerea*

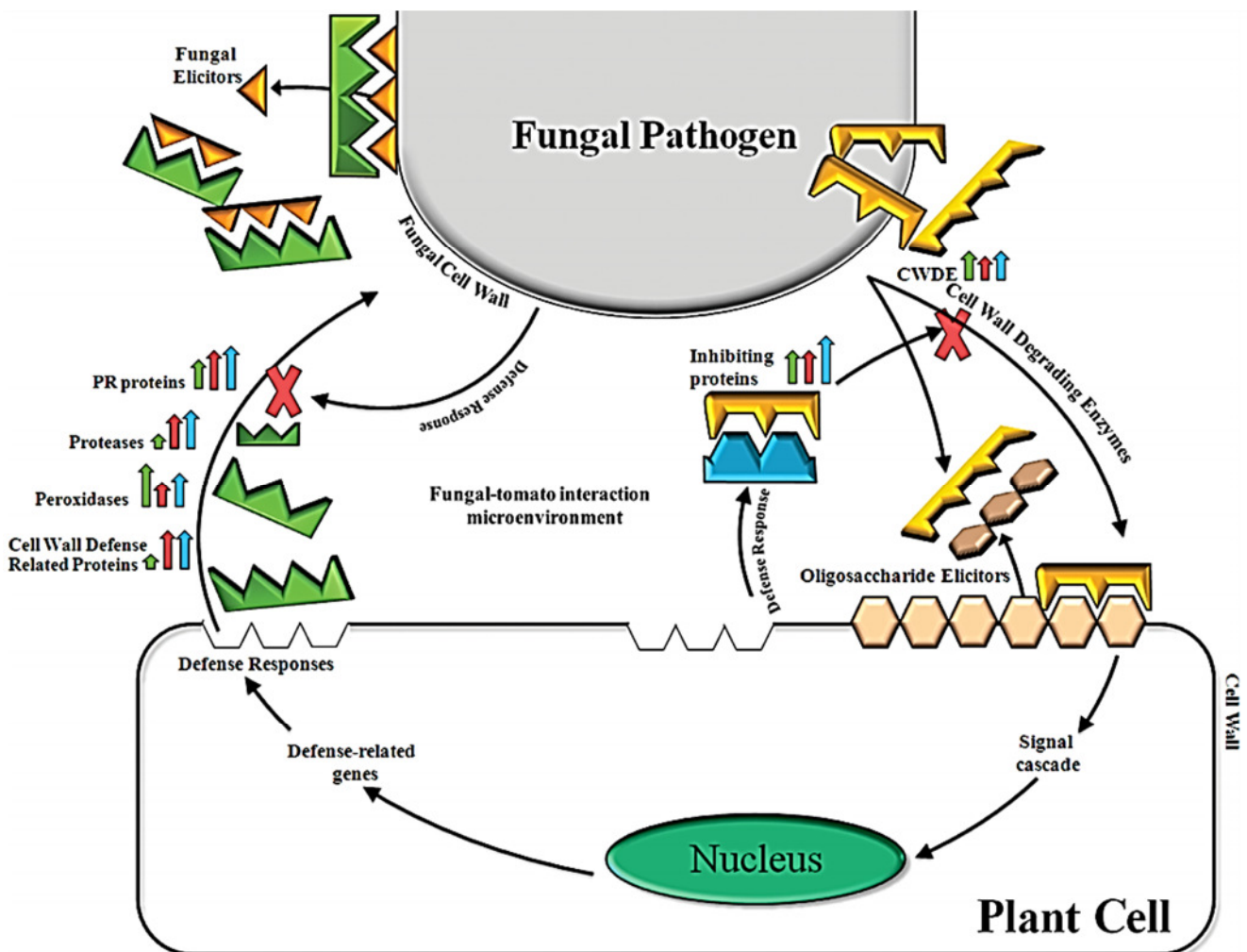
Nachdem zunächst ca. 15% der für Proteine codierenden Gene *in silico* als sekretiert vorhergesagt wurden (Choi *et al.*, 2010), legten Heard *et al.* (2015) ein „verfeinertes“

## Einleitung

*Botrytis*-Sekretom fest, welches mit 499 codierenden Genen ca. 3% des zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Genoms von ca. 16.000 Genen umfasst. Bisherige Analysen des extrazellulären Proteoms zeigten eine Variabilität in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen und Nährstoffverfügbarkeit. Im Sekretom einer für 16 h mit Pflanzenextrakten inkubierten *B. cinerea* Kultur wurden beispielsweise 105 sekretorische Proteine identifiziert (Espino *et al.*, 2010), während das Glyko-Sekretom, definiert durch Gonzales *et al.* (2014), 158 Proteine enthielt. Die meisten bisherigen Experimente wurden *in vitro* durchgeführt (González *et al.*, 2014) oder simulierten z.B. durch Zugabe von Pflanzenextrakten eine Infektion (Shah *et al.*, 2009a; 2009b; Fernández-Acero *et al.*, 2010; González-Fernández *et al.*, 2015). Erst kürzlich wurde eine neue Methode benutzt, um das pilzliche Sekretom von inokulierten Pflanzen zu isolieren, wodurch 259 während der Infektion durch *B. cinerea* sekretierte Proteine identifiziert werden konnten (Zhu *et al.*, 2017). Eine im *B. cinerea* Sekretom stark vertretene Proteinfamilie sind Proteasen. Lange Zeit galten diese als die am stärksten vertretene Gruppe (Billon-Grand *et al.*, 2002; ten Have *et al.*, 2004). Die Familie der Proteasen wird in Aspartyl-, Cystein-, Glutanyl-, Metallo- und Serinproteasen unterteilt (Espino *et al.*, 2010). Die im *B. cinerea* Sekretom meist abundanteste Protease ist die Aspartylprotease Bcap8, welche ca. 70% der Proteaseaktivität ausmachen kann. Die Deletion des entsprechenden Gens führte jedoch nicht zur verringerten Virulenz (ten Have *et al.*, 2010). Auch Deletionsmutanten und Doppel-Deletionsmutanten der für Bcap1-5 codierenden Gene zeigten weder Defekte in der proteolytischen Aktivität noch in der Virulenz (ten Have *et al.*, 2010). Die Glutanylprotease G1 Bcap1 ist ebenfalls im Sekretom stark vertreten (Espino *et al.*, 2010). Eine weitere im *B. cinerea* Sekretom abundante Gruppe sind CAZymes („Carbohydrate-Active enZymes“) (Zhu *et al.*, 2017). Sekretierte CAZymes sind beispielsweise Hydrolasen, Lyasen oder Esterasen, welche hauptsächlich für die Modifikation und den Abbau von Polysacchariden verantwortlich sind (Lombard *et al.*, 2014). Beispiele für Proteine im *Botrytis*-Sekretom sind u.a. Pektinasen, Cellulasen, Galacturonasen und Xylanasen (González-Fernández *et al.*, 2015). Auch andere Zellwand-abbauende Proteine wie z.B. Endo-Polygalacturonasen (PGs), Pektinmethylesterasen, Cutinasen und Laccasen, sowie Proteine unbekannter Funktion wurden identifiziert (Zhu *et al.*, 2017). Sekretierte Proteine wie Zellwand-abbauende Enzyme und Proteasen sind essentiell für eine erfolgreiche Penetration und Kolonisierung von Pflanzengewebe. Bei der aktiven Penetration müssen Cuticula und Zellwand der Wirtspflanze überwunden werden. Die pektinreichen Zellwände der dikotyledonen Wirtspflanzen von *B. cinerea* werden vor allem durch die Aktivität der PGs und Pektatlyasen angegriffen (Kars *et al.*, 2005). Die Relevanz der Proteasen im Sekretom besteht nach Poussereau *et al.* (2001) in erster Linie darin, durch den Abbau pflanzlicher Proteine die Mazeration des Wirtsgewebes zu fördern. Eine experimentelle Bestätigung dafür wurde allerdings noch nicht erbracht. Bei der Zersetzung

Einleitung

von Pflanzengewebe werden Oligosaccharide freigesetzt und als Nährstoffe für das Pathogen verfügbar, welche jedoch auch vom Wirt erkannt werden und die pflanzliche Abwehr induzieren (Jones und Dangl, 2006; Ferrari *et al.*, 2013). Bestandteile der pilzlichen Zellwand können zusätzlich die Pflanzenabwehr auslösen, welche z.B. in der Sekretion pflanzlicher Abwehrproteine wie Proteasen und Peroxidasen besteht. Pilzliche Proteasen sind in der Lage pflanzliche Abwehrproteine anzugreifen und schützen das Pathogen damit vor der Immunantwort der Wirtspflanze. Diese komplexe Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze beeinflusst die Pathogenität des Schaderregers stark (vgl. Abb. 3; Shah *et al.*, 2012; González-Fernández *et al.*, 2015).



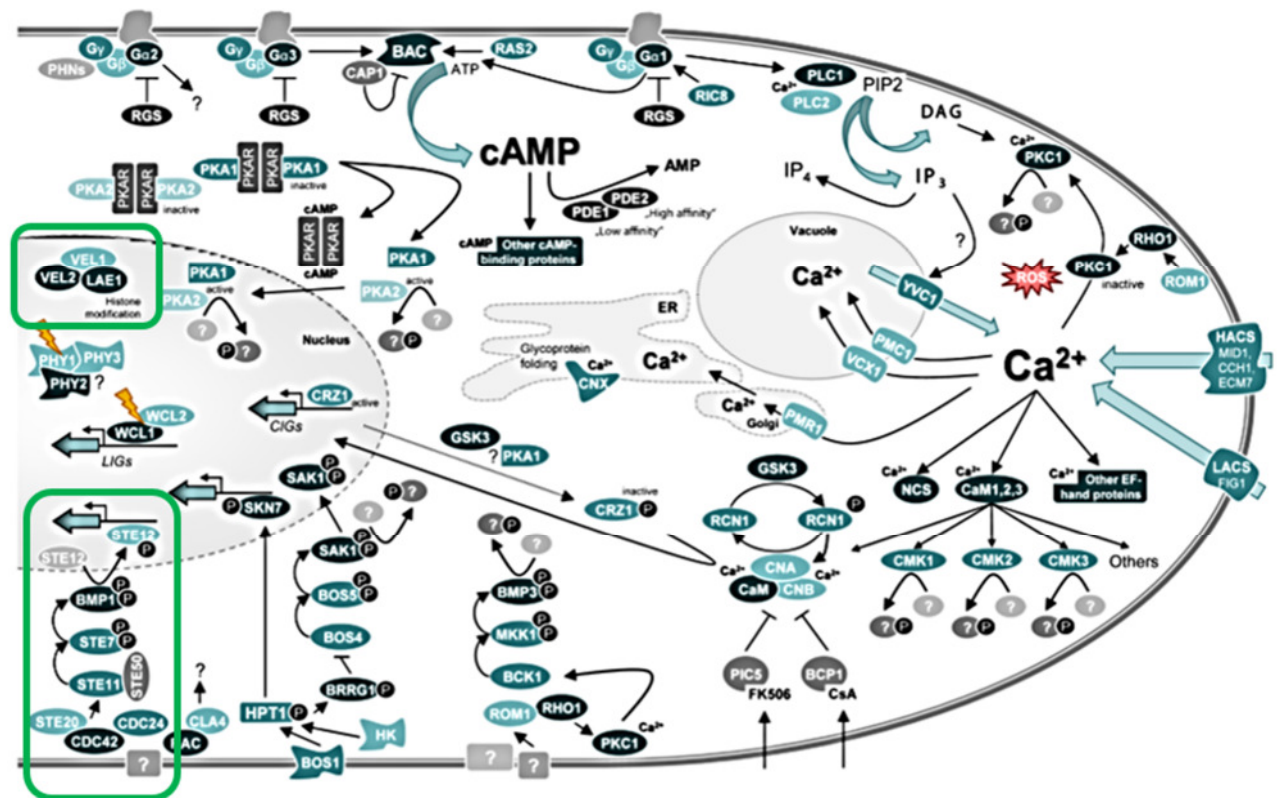
**Abb. 3: Schematische Darstellung der Pflanzen-Pilz-Interaktion mittels sekretierter Proteine.**

Durch den Pilz sekretierte Zellwand-abbauende Enzyme (CWDEs) greifen die pflanzliche Zellwand an. Die freigesetzten Oligosaccharide dienen als Nährstoffe für das Pathogen, elizitieren jedoch die Pflanzenabwehr. Ein Abbau der pilzlichen Zellwand kann ebenfalls die Pflanzenabwehr auslösen. Dies führt zur Sekretion pflanzlicher Abwehrproteine (Peroxidasen, Proteasen, PR Proteine). Der Pilz kann eigene Abwehrproteine sekretieren, um sich vor der Erkennung durch die Pflanze und vor pflanzlichen Proteinen zu schützen (Shah *et al.*, 2012).



### 3.2 Mechanismen der Signaltransduktion pathogener Pilze

Differenzierungsprozesse pathogener Pilze sind stark von Umweltreizen abhängig. Extrazelluläre Signale werden von Rezeptoren perzipiert und in Form von miteinander gekoppelten biochemischen Reaktionen intrazellulär weitergeleitet und dabei verstärkt. An solchen komplexen Signaltransduktionskaskaden sind eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen beteiligt. Auch Protein-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle im mehrstufigen Ablauf. Ziel der Signalweiterleitung ist meist die Änderung der Genexpression durch Regulierung von Transkriptionsfaktoren, die zur Anpassung der Zelle führt (Alberts *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2009). Viele dieser Signalwege sind in Hefen, filamentösen Pilzen, Pflanzen und Tieren stark konserviert, während einige art- oder gruppenspezifisch sind. Abb. 4 zeigt eine Zusammenfassung der Signaltransduktionswege in *B. cinerea*, welche die Differenzierung und Virulenz regulieren. Die in dieser Arbeit thematisierten Signalwege der MAPK-Kaskade BMP1 und des VELVET-Komplexes sind hervorgehoben. Obwohl diese nur einen kleinen Ausschnitt darstellen, sind beide für die Virulenz des Pathogens ausgesprochen relevant und werden im Folgenden näher betrachtet.



**Abb. 4: Schematische Zusammenfassung der Signaltransduktionskaskaden, welche die Differenzierung und Virulenz in *B. cinerea* regulieren.**

Zu den in *B. cinerea* für Differenzierungsprozesse und Pathogenese wichtigen Signalwegen gehören Monomere G-Proteine (kleine GTPasen), G-Protein gekoppelte Rezeptor-Systeme, zyklische AMP (cAMP) Kaskaden, die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Signaltransduktion, Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskaden und Histidinkinase-Phosphorelay Systeme. In dieser Dissertation liegt ein Fokus auf der Rolle des VELVET-Komplexes und der BMP1-MAPK-Kaskade (beide grün eingrahmt) (modifiziert nach Schumacher, 2016a).

### 3.2.1 MAPK-Kaskaden in *B. cinerea*

MAPK-Kaskaden sind in Eukaryonten stark konserviert. Diese Signalwege sind aus drei hintereinander geschalteten Kinasen (MAPKKK→MAPKK→MAPK) aufgebaut, welche nacheinander phosphoryliert und somit aktiviert werden (Alberts *et al.*, 2005). Die MAPK kann am Ende der Signalkaskade im Cytosol oder nach Translokation in den Zellkern Zielproteine phosphorylieren und dadurch eine Änderung der Genexpression und des Stoffwechsels bewirken (Gustin *et al.*, 1998; Schaeffer und Webber, 1999).

Wie in den meisten filamentösen Ascomyceten wurden auch in *B. cinerea* drei konservierte MAPK-Kaskaden identifiziert (Xu, 2000). Deletionsmutanten der zu Slr2 aus Hefe orthologen Bmp3-MAPK zeigten pleiotrope Defekte wie generelle Wachstumsdefekte, eine erhöhte Sensitivität gegenüber osmotischem und oxidativem Stress, die Beeinträchtigung der Konidienbildung und den Verlust der Fähigkeit zur Sklerotienbildung. Die Penetrations- und Infektionsfähigkeit der Mutanten war reduziert (Rui und Hahn, 2007). Das Hog1 Ortholog BcSak1 in *B. cinerea* reguliert auf unterschiedliche Arten die Antwort sowohl auf osmotischen als auch oxidativen Stress (Heller *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2011a). Die Abwesenheit von BcSak1 führt neben einer erhöhten Stressempfindlichkeit u.a. zum Verlust der Sporenbildung, während die Bildung von Sklerotien nicht betroffen ist. Eine Penetration von intaktem Pflanzengewebe durch die Mutante ist nicht möglich (Segmüller *et al.*, 2007). Die dritte konservierte MAPK-Kaskade in *B. cinerea* ist ortholog zur Kss1-Kaskade. In *Magnaporthe oryzae* reguliert die zu BMP1 orthologe MAPK Pmk1 die Appressorienbildung und die Penetration (Zhao *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). Orthologe dieser MAPK-Kaskade in anderen pathogenen Pilzen wie *Fusarium oxysporum* (Di Pietro *et al.*, 2001), *Colletotrichum lagenarium* (Takano *et al.*, 2000), *S. sclerotiorum* (Chen *et al.*, 2004), *Ustilago maydis* (Kahmann und Kamper, 2004) oder *Mycosphaerella graminicola* (Cousin *et al.*, 2006) sind ebenfalls wichtige Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren. Das MAPK-Modul Ste11-Ste7-BMP1 in *B. cinerea* ist essentiell für die Erkennung hydrophober Oberflächen (Doehlemann *et al.*, 2006). *bmp1* Deletionsmutanten weisen eine verringerte Wachstumsrate auf, bilden keine appressorienähnlichen Strukturen und sind apathogen. Mutanten in Ste11, Ste7, oder dem MAPK Adapterprotein Ste50, zeigen einen zur *bmp1* Mutante sehr ähnlichen Phänotyp. Sie sind durch Störungen in der hydrophoben Keimung, verzögertes vegetatives Wachstum, kleinere Konidien, fehlende Sklerotienbildung und den Verlust der Pathogenität gekennzeichnet (Zheng *et al.*, 2000; Schamber *et al.*, 2010). Die Signalwege in *B. cinerea* ober- und unterhalb der Pathogenitäts MAPK-Kaskade sind bislang erst wenig charakterisiert worden. Der Transkriptionsfaktor Ste12 wird mit BMP1 in Verbindung gebracht, die Deletion von *ste12* führt jedoch u.a. mit reduzierter Penetration und verzögerter Läsionsbildung zu weniger gravierenden Defekten als eine Deletion der MAPK Komponenten. Es müssen daher noch andere molekulare Komponenten für die Zellantwort verantwortlich sein, welche

Einleitung

durch die BMP1-Kaskade bedingt ist (Schamber *et al.*, 2010). Auf eine mögliche Aktivierung der MAPK-Kaskade durch die putativen Sensorproteine Sho1 und Msb2 wird im nachfolgenden Abschnitt näher eingegangen.

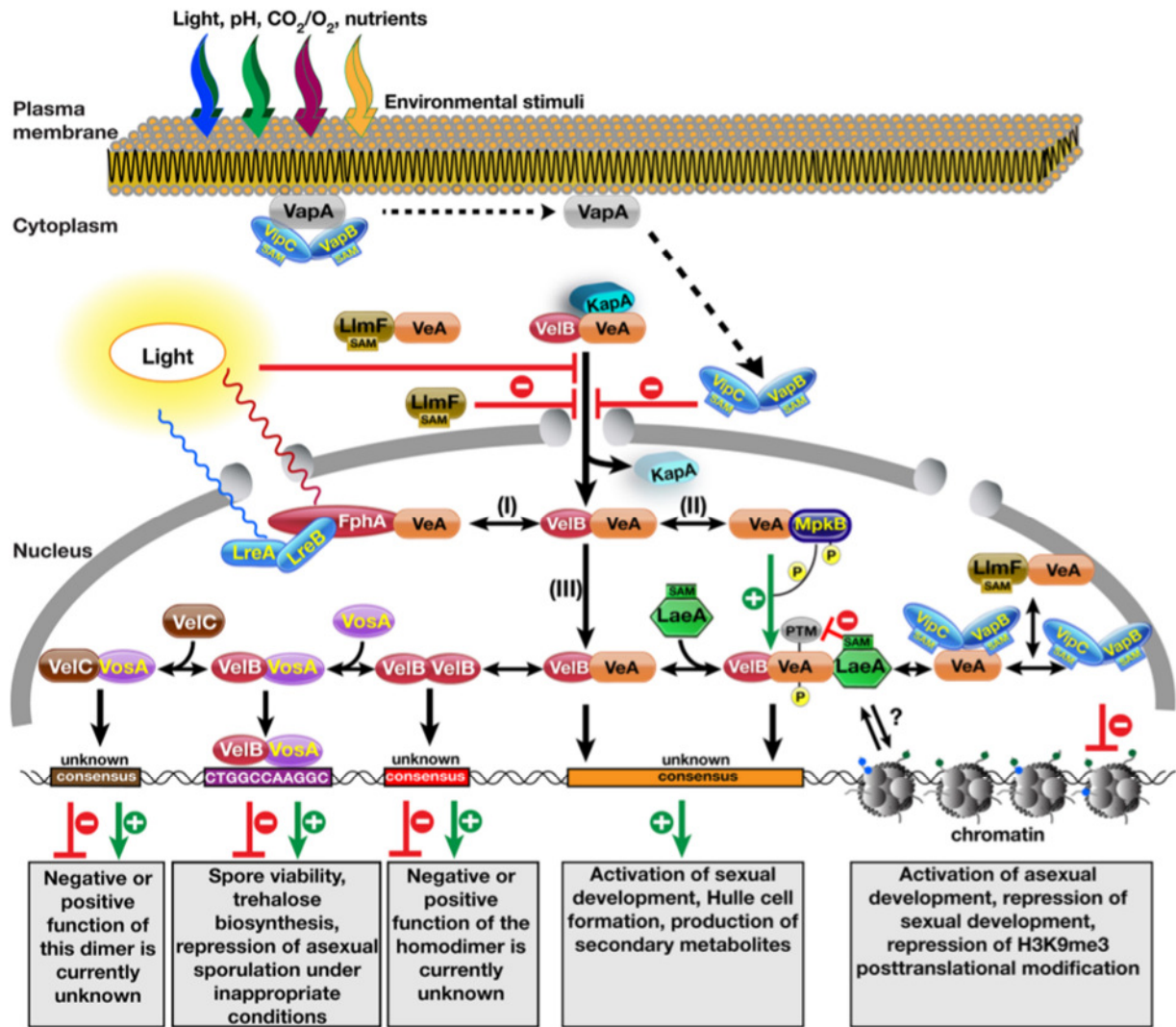
### 3.2.1.1 Die Sensorproteine Msb2 und Sho1

In Hefe erfolgt die Aktivierung der Kss1-MAPK-Kaskade durch die Signal-Mucine Msb2 und Hkr1 (Pitoniak *et al.*, 2009), welche in der Plasmamembran verankert sind und neben einem kleinen cytosolischen C-Terminus eine große, stark glykosylierte extrazelluläre Domäne aufweisen (Cullen *et al.*, 2004). Zusätzlich reguliert Msb2 im Zusammenspiel mit dem ebenfalls membranständigen Sho1 die Signaltransduktion in Reaktion auf osmotischen Stress und aktiviert die Hog1-MAPK-Kaskade (Chen und Thorner, 2007). Im Gegensatz zu Msb2 besitzt Sho1 keine extrazelluläre Domäne. Es besteht aus vier Transmembrandomänen sowie einer stark konservierten C-terminalen SH3-Domäne im Cytosol, welche wie die intrazelluläre Domäne von Msb2 der Signalweiterleitung dient (Maeda *et al.*, 1995; Vadaie *et al.*, 2008).

Die Deletion von *sho1* in *S. cerevisiae* führt zur erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem und osmotischem Stress (Román *et al.*, 2005). Zusätzlich ist Sho1 essentiell für die Cytokinese (Labeledzka *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu Hefe sind Msb2 und Sho1 in *U. maydis* vom Hog1-Signalweg entkoppelt und nicht für die generelle Stressantwort, sondern ausschließlich für die Appressorienbildung, Penetration und Pathogenität verantwortlich (Lanver *et al.*, 2010). Msb2 und Sho1 agieren oberhalb der zu Fus3/Kss1 orthologen MAPK Kpp2 und Kpp6 (Hamel *et al.*, 2012). Während die *msb2* Mutante in *M. oryzae* signifikant reduzierte Appressorienbildung und Virulenz zeigt, ist die *sho1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert. Die *msb2/sho1* Doppelmutante ist nicht mehr in der Lage Appressorien zu bilden und ist apathogen. Msb2 und Sho1 fungieren oberhalb der Pmk1-MAPK und sind nicht an der Adaptation an oxidativen und osmotischen Stress beteiligt (Liu *et al.*, 2011b). In *F. oxysporum* zeigen Msb2 und Sho1 teilweise redundante Funktionen (Pérez-Nadales und Di Pietro, 2011). Beide Proteine werden für die Phosphorylierung der MAPK Fmk1 (Kss1 Ortholog) benötigt und sind u.a. wichtig für Penetration und invasives Wachstum (Pérez-Nadales und Di Pietro, 2015). In *B. cinerea* ist Msb2 als Oberflächensensor oberhalb der BMP1-MAPK-Kaskade an der Regulation der Appressorienbildung und der Penetration beteiligt. Die verzögerte Infektion durch *msb2* Deletionsmutanten kann durch Verwundung des Blattgewebes vollständig aufgehoben werden (Leroch *et al.*, 2015).

### 3.2.2 Der VELVET-Komplex

Während viele Signalwege, wie beispielsweise MAPK-Kaskaden stark konserviert sind, haben filamentöse Pilze zusätzlich spezifische Signalwege entwickelt. Ein Beispiel dafür sind die Proteine der VELVET-Familie, welche erstmals in *Aspergillus nidulans* beschrieben wurden, in Ascomyceten und Basidiomyceten stark konserviert, jedoch nicht in Hefe zu finden sind (Ni und Yu, 2007; Bayram und Braus, 2012). Der VELVET-Komplex in *A. nidulans* steuert lichtabhängige Prozesse wie die Aktivierung von Genen der sexuellen Entwicklung (Kim *et al.*, 2002) und beeinflusst die Bildung von Sekundärmetaboliten (Kato *et al.*, 2003; Bayram *et al.*, 2008; vgl. Abb. 5). Die vier VELVET-Proteine VeA, VelB („VeA like protein B“), VelC und VosA in *A. nidulans* weisen DNA-bindende Domänen auf und können sowohl mit sich selbst als Homodimer, in Variationen miteinander, oder z.B. mit Methyltransferasen interagieren (Ahmed *et al.*, 2013; Sarikaya-Bayram *et al.*, 2014, Gerke und Braus, 2014). Der VELVET-Komplex stellt ein Heterotrimer der VELVET-Proteine VeA-VelB mit der Methyltransferase LaeA („loss of aflR expression A“) im Nukleus dar (Palmer *et al.*, 2013). In *A. nidulans* bilden die VELVET-Proteine VeA und VelB ein Heterodimer im Cytosol. Dieses wird über das  $\alpha$ -Importin KapA mittels eines NLS ("nuclear localisation signal") in VeA in den Zellkern transportiert (Stinett *et al.*, 2007). Da VelB in *A. nidulans* kein NLS besitzt, wird es mithilfe von VeA co-translokalisiert. Die Translokation des VeA-VelB-Komplexes in den Zellkern wird durch Lichteinfluss oder andere externe Signale reguliert. Hier werden beispielsweise Methyltransferasen (VipC, VapB, LlmF) aktiviert, welche an VeA binden, und somit die Bildung des VELVET-Komplexes verhindern (Calvo und Cary, 2015). Während in Yeast two-hybrid Experimenten die Interaktion zwischen VeA und LaeA nachgewiesen werden konnte, war keine Verbindung zwischen VelB und LaeA detektierbar. Demnach dient VeA im VELVET-Komplex als „bridging factor“ (Bayram *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012). Im Nukleus kann VeA-VelB auch neben der Bildung des VELVET-Komplexes zusätzlich als Heterodimer agieren und die sexuelle Entwicklung beeinflussen (Sarikaya-Bayram *et al.*, 2015). Die Affinität von VeA zu VelB kann durch eine Phosphorylierung durch die MAPK MpkB gesteigert werden. Während die Funktion des tetrameren Komplexes durch Interaktion von VeA-VelB mit dem Rotlicht-Rezeptorprotein Phytochrom FphA und den Blaulicht-Rezeptoren LreA-LreB noch ungeklärt ist (Purschwitz *et al.*, 2009), reguliert das Heterodimer der beiden VELVET-Proteine VelB-VosA u.a. die Sporenreifung (Sarikaya-Bayram *et al.*, 2010). Die beiden VELVET-Proteine VosA und VelC können ebenfalls ein Heterodimer bilden (Sarikaya-Bayram *et al.*, 2015). VelC wurde eine positive Rolle bei der Bildung von Kleistothecien, sowie eine Inhibierung der Konidienbildung zugeschrieben (Park *et al.*, 2014).

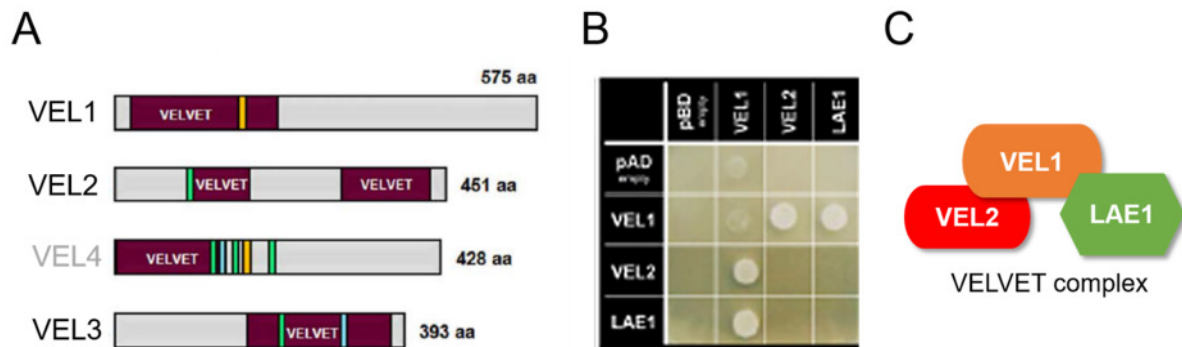


**Abb. 5: Schematisches Modell der Kontrolle des Sekundärmetabolismus und der Entwicklung durch VELVET-Proteine und Methyltransferasen in *A. nidulans*.**

Das  $\alpha$ -Importin KapA vermittelt den lichtabhängigen Transport des VeA-VeB Heterodimers in den Zellkern. Das Heterotrimer der Methyltransferasen VipC-VapB wird nach der Perzeption unbekannter Signale (z.B. Licht, pH, CO<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub>) aus der Interaktion mit VapA an der Plasmamembran gelöst und gelangt ebenfalls in den Zellkern. Der Eintritt von VeA in den Zellkern wird sowohl während der Translokation von VipC-VapB, als auch von der Methyltransferase LlmF inhibiert, welche einen Komplex mit VeA bildet. Kommt es zum Import von VeA-VelB in den Nukleus, kann (I) durch Interaktion mit dem Rotlicht-Rezeptorprotein Phytochrom FphA und den Blaulicht-Rezeptoren LreA-LreB ein Tetramer gebildet werden, oder (II) die MAPK MpkB phosphoryliert VeA und verstärkt so die Affinität zu VelB. Der trimäre Komplex VelB-VeA-LaeA (III) wird gebildet und die verschiedenen Interaktionsformen der VELVET-Proteine regulieren sexuelle/asexuelle Differenzierung und Sekundärmetabolismus (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2015).

### 3.2.2.1 Die Rolle des VELVET-Komplexes in *B. cinerea*

In *B. cinerea* wurden bislang vier VELVET-Familien-Proteine als Orthologe der Proteine in *A. nidulans* identifiziert (vgl. Abb. 6A). Yeast two-hybrid Analysen bestätigten, dass die VELVET-Proteine VEL1 (VeA-Ortholog), VEL2 (VelB-Ortholog) und die Methyltransferase LAE1 (LaeA-Ortholog) entsprechend den Analysen in *A. nidulans* den VELVET-Komplex bilden (vgl. Abb. 6B,C; Schumacher *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2015).



**Abb. 6: Die VELVET-Familien Proteine in *B. cinerea*.**

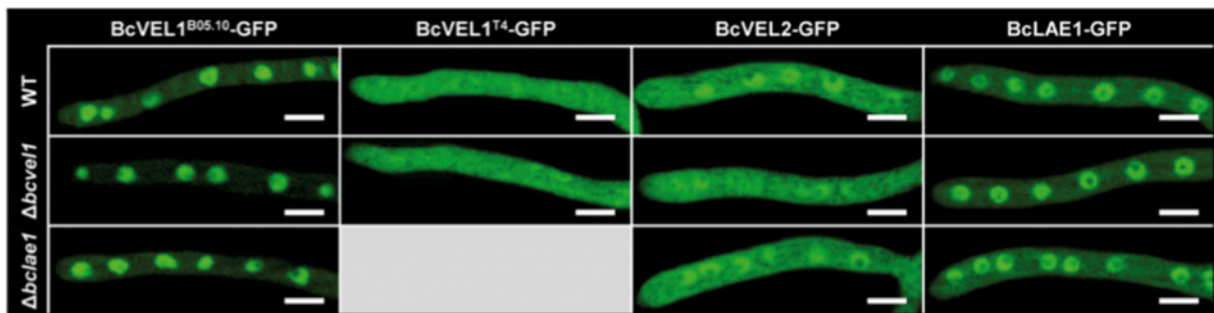
(A) Architektur der 4 VELVET-Proteine, putative Kernlokalisierungs-Signale sind grün, Kern-Export-Signale blau, und PEST Domänen orange gekennzeichnet. (B) Im Yeast two-hybrid Experiment interagieren VEL1 und VEL2 miteinander, sowie VEL1 und LAE1. (C) In einem aus (B) erstellten Interaktionsmodell des VELVET-Komplexes dient VEL1 als Brücke zwischen VEL2 und LAE1, welche nicht direkt miteinander interagieren (modifiziert (A, B), bzw. erstellt (C) nach Schumacher *et al.* 2012 und Schumacher *et al.*, 2015: Die Namensbezeichnungen der Proteine Vel3 und Vel4 sind in dieser Dissertation aufgrund der Homologie zu Proteinen in *A. nidulans* im Vergleich mit Schumacher *et al.*, vertauscht).

Das Gen für das VosA-Ortholog Vel4 scheint in *B. cinerea* nicht exprimiert zu sein (Schumacher *et al.*, 2012), die Funktion von Vel3 (VelC-Ortholog) war zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt.

Die Deletion von *vel1* in *B. cinerea* führt zu Defekten der lichtabhängigen Differenzierung: Die Sklerotienbildung bleibt aus und es werden stattdessen auch in Dunkelheit massiv Konidien produziert. Die Mutanten zeigen außerdem eine gesteigerte Melanin-Bildung und erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress. Die Fähigkeit zur aktiven Ansäuerung geht verloren und die Mutanten weisen gravierende Virulenzdefekte auf. Nach der Inokulation mit *vel1* Sporen entsteht zunächst eine Primärläsion, die sich in den meisten Fällen nicht zu einer Sekundärläsion ausbreitet (Schumacher *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Aus dem Freiland isolierte *B. cinerea* Stämme mit Mutationen in *vel1*, welche durch Abbruch der Translation verkürzte VEL1-Proteine besitzen (VEL1<sup>T4</sup> und VEL1<sup>1750</sup>), zeigten ähnliche Defekte wie *vel1* Mutanten (Schumacher *et al.* 2012; 2013). Die Deletion von *vel2* im Laborstamm 38B1 führte zu einem ähnlichen Phänotyp wie die von *vel1* (Yang *et al.*, 2012). Auch die Mutagenese von *lae1* führt zu deutlich eingeschränkter Virulenz und dem Verlust der Sklerotienbildung (Schumacher *et al.*, 2015). Obwohl einige Gene, die für Schlüsselenzyme der Sekundärmetabolit-Synthese codieren, *in vitro* sowohl in *vel1*, als auch in *lae1* deutlich schwächer exprimiert waren, konnte keine veränderte Produktion der Toxine Botrydial und Botcinin festgestellt werden (Schumacher *et al.*, 2015). Während der Infektion von Bohnenblättern durch *vel1* konnte mittels Microarray-Analysen keine signifikant veränderte Expression der Toxincluster-Gene gezeigt werden. Mehrere der in *vel1* im Vergleich zum Wildtyp schwächer exprimierten Gene codieren für sekretierte Proteasen. Diese erste Transkriptomanalyse ergab auch, dass mehrere Gene für Transporter und

Glykosylhydrolasen in VELVET-Mutanten verstärkt exprimiert werden (Schumacher *et al.*, 2012).

Anders als in *A. nidulans* konnte bei der Analyse des VELVET-Komplexes in *B. cinerea* keine Lichtabhängigkeit der Lokalisierung festgestellt werden. GFP-markierte, funktionelle Derivate von LAE1 und VEL1 sind stets deutlich im Nukleus lokalisiert, VEL2 zeigt zusätzlich Signale im Cytosol. Die Deletion von *vel1* oder *lae1* hat keinen Einfluss auf die Lokalisierung der beiden Proteine. Die im *B. cinerea* Stamm T4 vorhandene, im Gegensatz zum Wildtyp-Protein von 575 auf 184 Aminosäuren verkürzte Version VEL1<sup>T4</sup> ist jedoch nicht mehr im Kern lokalisiert (vgl. Abb. 7; Schumacher *et al.*, 2015).

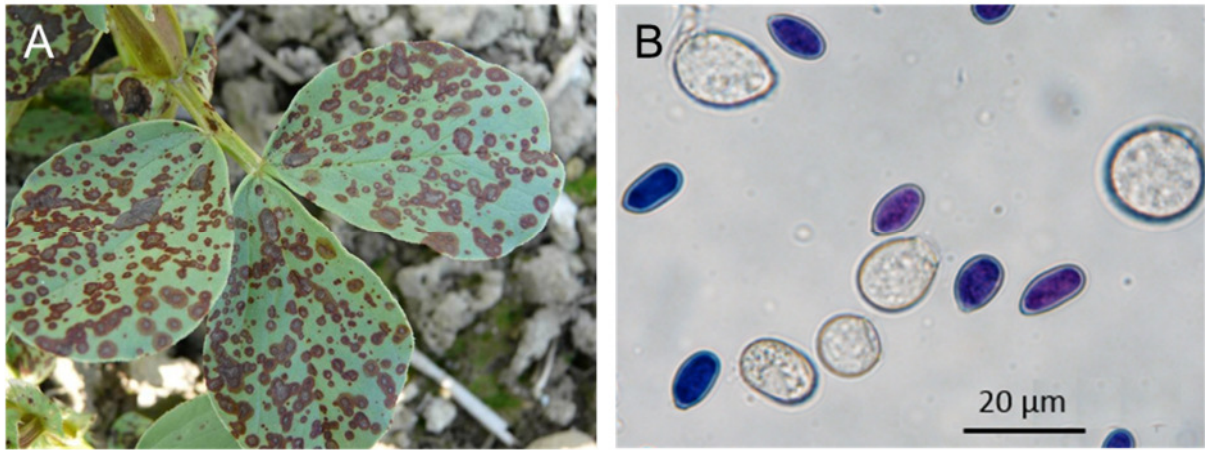


**Abb. 7: Lokalisierung der VELVET-Komplex-Proteine in *B. cinerea*.**

Während LAE1 und vor allem VEL1 im Nukleus lokalisiert sind, zeigt sich VEL2 zusätzlich im Cytosol. Die Lokalisierung ist dabei in den beiden Mutanten *vel1* und *lae1* unverändert. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein (575 Aminosäuren) ist die auf 184 Aminosäuren verkürzte Version VEL1<sup>T4</sup> nicht mehr im Kern lokalisiert. Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu$ m (Schumacher *et al.*, 2015).

### 3.3 *Botrytis fabae*

Die beiden *Botrytis* Arten *B. fabae* und *B. cinerea* sind phylogenetisch sehr eng miteinander verwandt (Staats *et al.*, 2005; Plesken, 2014), unterscheiden sich aber deutlich in ihrem Infektionsverhalten. Während *B. cinerea* ein enormes Wirtsspektrum aufweist, ist *B. fabae* ein wirtsspezifisches Pathogen. *B. fabae* wurde 1929 von Sardiña als Pathogen der Ackerbohne *Vicia faba* beschrieben und kann einige Arten der Leguminosen-Gattungen *Vicia*, *Lens*, *Pisum* und *Phaseolus* befallen (Jarvis *et al.*, 1977). Typische Symptome sind punktförmige braune Nekrosen, welche sich auf Blättern, Blüten oder dem Stängel der Pflanze zu sogenannten „Schokoladenflecken“ (dunkle Läsionen mit hellem Zentrum) ausbreiten (vgl. Abb. 8A; Harrison, 1988). Phänotypisch kann *B. fabae* anhand der deutlich größeren Sporen unterschieden werden (vgl. Abb. 8B). Unter Laborbedingungen konnte für *B. fabae* ein reduziertes vegetatives Wachstum und eine schwächere Sporulation beobachtet werden. *B. fabae* bildet im Vergleich zu *B. cinerea* kleinere und mehr Sklerotien (Backhouse und Willets, 1984; Plesken, 2014). Eine Differenzierung anhand der hervorgerufenen Läsionen auf *V. faba* durch *B. fabae*, *B. cinerea* oder *B. fabiopsis* ist jedoch nicht möglich (Harrison, 1984; Harrison, 1988; Zhang *et al.*, 2010).



**Abb. 8: Phänotypische Merkmale von *Botrytis fabae*.**

**(A)** Mit *B. fabae* infiziertes Blatt von *Vicia faba* zeigt die typischen „Schokoladenflecken“; **(B)** *B. cinerea* Sporen (blau) sind deutlich kleiner als die von *B. fabae* (Quelle: AG Phytopathologie TU KL).

Insgesamt zeigen sich *B. fabae* Arten aggressiver auf *V. faba* als *B. cinerea* (Harrison, 1988). Im direkten Vergleich dringt der Spezialist schneller in die Pflanze ein und eine größere Anzahl an Epidermiszellen wird effektiv abgetötet (Hutson und Mansfield, 1980). Mehrere Versuchsansätze geben Hinweise darauf, dass *B. fabae* das von *V. faba* während der Infektion gebildete Phytoalexin Wyeronsäure und dessen Derivate effizienter metabolisieren und somit deren Akkumulation verhindern kann, was möglicherweise die im Vergleich geringere Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen bedingt (Fawcett *et al.*, 1971; Mansfield und Widdowson, 1973; Hargreaves *et al.*, 1977; Davidson *et al.*, 2004). Dennoch bleibt unklar, welche molekularen Grundlagen *B. fabae* zu einem Spezialisten auf Ackerbohne machen, und warum die Infektion anderer Wirtspflanzen wie z.B. von Tomatenblättern - ähnlich wie bei VELVET-Mutanten - im Primärläsionsstadium stoppt.



### 3.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Bedeutung von Sho1 für die Regulation der Infektion von *B. cinerea* durch phänotypische Charakterisierung von *sho1* Deletionsmutanten und *msb2/sho1* Doppelmutanten analysiert werden. Da Sho1 bei anderen Pilzen oberhalb von MAPK-Kaskaden gemeinsam mit Msb2 als Sensorprotein fungiert, sollte auch die Rolle von Sho1 bei der Aktivierung von BMP1 überprüft werden.

Eine weitere Frage betraf den Einfluss der BMP1-MAPK-Kaskade auf die Differenzierung und Pathogenese von *B. cinerea*. Ziel war es, durch die Mutagenese keimungs- bzw. BMP1-regulierter Gene Hinweise zu erbringen, welche der MAPK nachgeschalteten Proteine die Defekte der *bmp1* Mutante verursachen. Zwei mit BMP1 interagierende Proteine sollten ebenfalls durch Deletion der Gene analysiert und deren Rolle bei der Infektion aufgeklärt werden.

Als Hauptteil dieser Dissertation sollte die Rolle des VELVET-Komplexes während der Infektion untersucht werden. Dabei lag ein Fokus auf vergleichenden Analysen von Wildtyp und VELVET-Mutanten bzgl. ihrer pathogenen Differenzierung, der Infektion, der Änderung des externen pH-Werts und der Ausscheidung organischer Säuren. Durch diese phänotypischen Untersuchungen und einen quantitativen Vergleich der pilzlichen *in planta* Transkriptome und Sekretome sollten Hinweise auf die physiologischen und molekularen Ursachen der reduzierten Virulenz der VELVET-Mutanten erhalten werden. Um Aufschluss über die Zusammensetzung der durch *B. cinerea* während der Infektion sekretierten Proteine und deren mögliche Bedeutung zu erhalten, sollte eine quantitative Sekretomanalyse mit Hilfe des „<sup>15</sup>N metabolic labeling“ etabliert werden. Insbesondere sollte die Bedeutung der Azidifizierung des Pflanzengewebes und der Sekretion organischer Säuren, besonders von Oxalat, für die Pathogenese von *B. cinerea* überprüft werden.

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation bestand in vergleichenden phänotypischen, Transkriptom- und Sekretom-Analysen von *B. cinerea* und *B. fabae* während der Infektion verschiedener Wirtspflanzen, um die Diskussion neuer Erklärungsansätze der Wirtsspezifität zu ermöglichen.

## 4. Ergebnisse

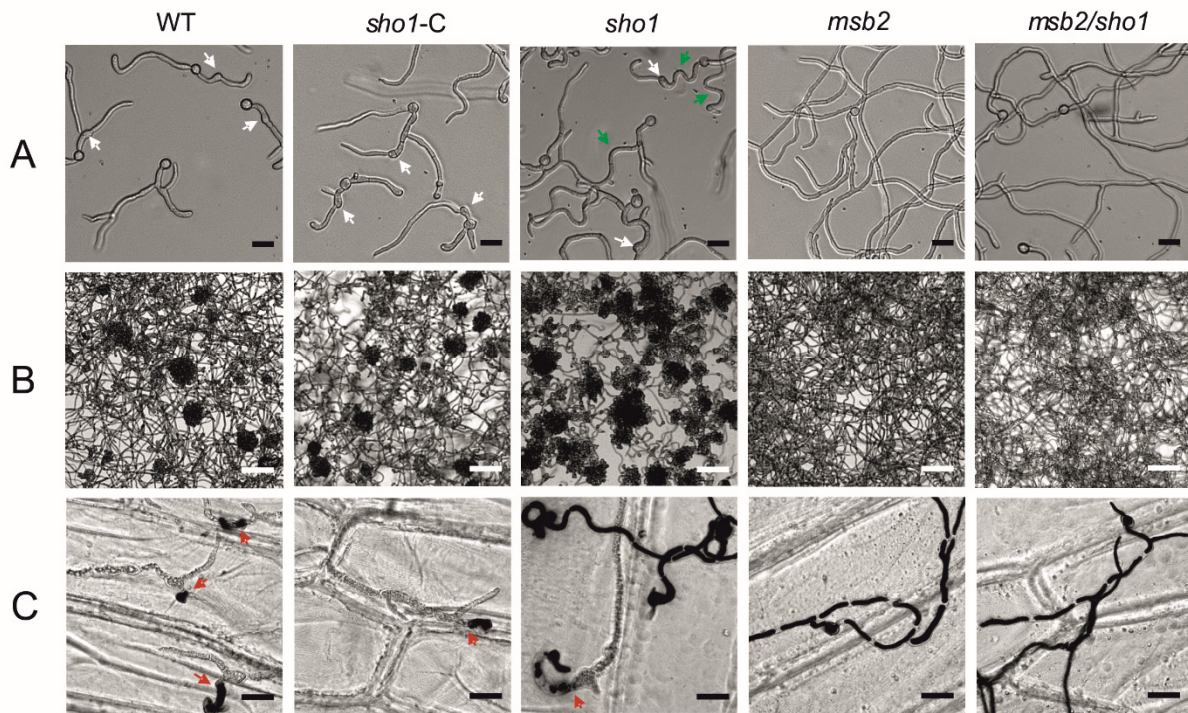
### 4.1 Die Funktion der Sensorproteine Sho1 und Msb2

#### 4.1.1 Erstellung von *sho1* und *msb2/sho1* Mutanten

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das für das putative Sensorprotein Sho1 codierende Gen im *B. cinerea* Stamm B05.10 deletiert und durch eine Hygromycin-Kassette ersetzt. Zur Komplementation der Deletion wurde ein Sho1-Komplementationskonstrukt (Nixdorf, 2013) mit 1437 bp des Promotorbereichs, der codierenden Region von *sho1* und dem *Tgluc* Terminator in den *niiA*-Lokus der *sho1* Mutante integriert. Für vergleichende Analysen sowie die Erstellung einer *msb2/sho1* Doppelmutante wurde die bereits charakterisierte *msb2* Mutante verwendet (Leroch *et al.*, 2015). Der Doppel-KO wurde durch die Insertion einer Nourseothricin-Resistenzkassette in das *sho1* Gen der *msb2* Mutante erzeugt. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung aller in dieser Arbeit erzeugten *B. cinerea* Mutanten findet sich in Kapitel 6.5.

#### 4.1.2 Sho1 beeinflusst Oberflächenerkennung, Hyphendifferenzierung und vegetatives Wachstum

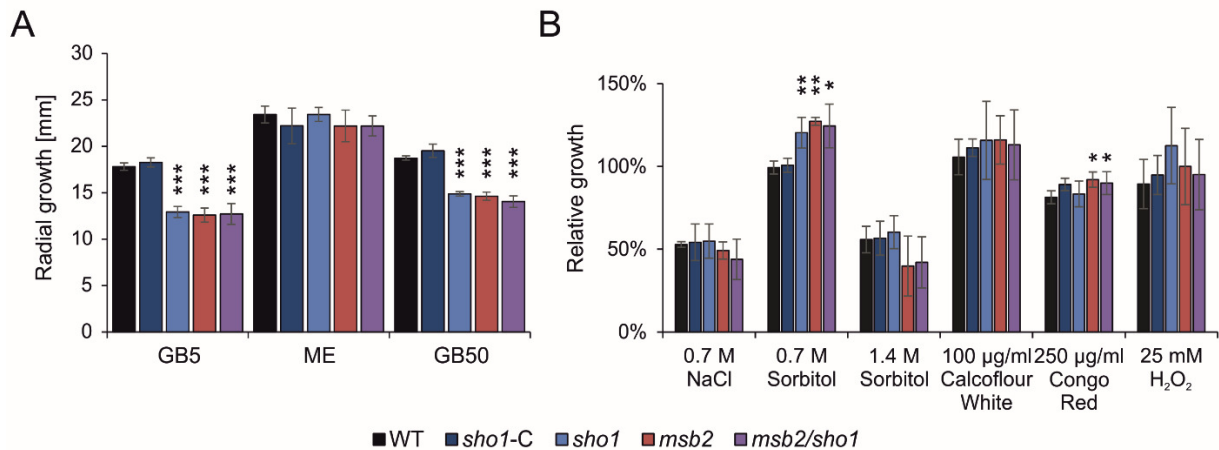
Im Vergleich zum Wildtyp und der *sho1* Komplementante wurden von der *sho1* Mutante weniger Keimschläuche pro ausgekeimter Spore gebildet. Obwohl sich auch bei *sho1* nahezu jeder Keimschlauch zu einem Appressorium differenzierte, war im Vergleich zum Wildtyp und der Komplementanten die Gesamtanzahl der gebildeten Appressorien reduziert (Abb. Anhang 1A,B; Abb. 9A). Auf abgetöteten Zwiebelepidermen penetrierte die *sho1* Mutante die Oberfläche etwas weniger effektiv als der Wildtyp, ca. 30% der Keimschläuche wuchsen lediglich auf der Oberfläche (Abb. 9C, Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde eine größere Anzahl an infection cushions beobachtet (Abb. Anhang 1C; Abb. 9B). Eine weitere phänotypische Besonderheit der *sho1* Mutante war das Auftreten von „spiralförmig gekräuselten“ Hyphen. Diese machten ca. 20% aller Hyphen aus und konnten vereinzelt auch bei *msb2* Mutanten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt kann damit auch bei *sho1* Mutanten ein gewisser Oberflächenerkennungsdefekt beobachtet werden, der jedoch kaum Auswirkungen auf die Penetrationsfähigkeit hat. Die *msb2/sho1* Doppelmutante wies dieselben Differenzierungsdefekte wie *msb2* auf: Es wurden weder Appressorien noch infection cushions differenziert, und im Vergleich zum Wildtyp deutlich längere Hyphen gebildet (Abb. 9A,B; Leroch *et al.*, 2015). Wie bei *msb2* erfolgte keine Penetration von abgetöteten Zwiebelepidermiszellen (Abb. 9C).



**Abb. 9: Differenzierung von *B. cinerea* Wildtyp und Mutanten auf verschiedenen Oberflächen.**

(A) Differenzierung der Hyphen auf Glas (18 h). Beispiele für appressoriale Strukturen sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (B) Bildung von infection cushions nach 48 h auf Glas. (C) Penetration von abgetöteten Zwiebelepidermiszellen (24 h). Sporen und Hyphen oberhalb der Epidermis sind mit Trypanblau angefärbt. Penetrationsstellen sind mit roten Pfeilen markiert. Maßstabsbalken: 20 µm (A, C) bzw. 200 µm (B).

Sowohl auf Minimalmedium mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen, als auch auf Vollmedium war das vegetative Wachstum von *sho1* und *msb2*, sowie *msb2/sho1* Doppelmutanten gleichermaßen reduziert (Abb. 10A). Die relative Wachstumsinhibition durch osmotischen oder Salz-induzierten Stress (1,4 M Sorbitol; 0,7 M NaCl), sowie die Anwesenheit von Calcoflour white (Zellwand-Stress) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oxidativer Stress) zeigten keine Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 10B). Die Zugabe von Kongorot (Zellwand-Stress) inhibierte den Wildtyp, die *sho1*-Komplementante, sowie *sho1* signifikant stärker als *msb2* und *msb2/sho1*. Es konnte beobachtet werden, dass eine osmotische Stabilisierung des Mediums durch Anwesenheit von 0,7 M Sorbitol das relative Wachstum von *sho1*, *msb2* und der Doppelmutante *msb2/sho1* im Vergleich zum Wildtyp signifikant verbesserte (Abb. 10B). Damit konnte gezeigt werden, dass Sho1 im Vergleich zu Msb2 einen deutlich geringeren Einfluss auf die pathogene Differenzierung, die Entwicklung und das Wachstum der Hyphen hat. Der Verlust beider Sensorproteine führt in Bezug auf Hyphendifferenzierung und vegetatives Wachstum zum gleichen Phänotyp wie der *msb2* Einzel-KO.



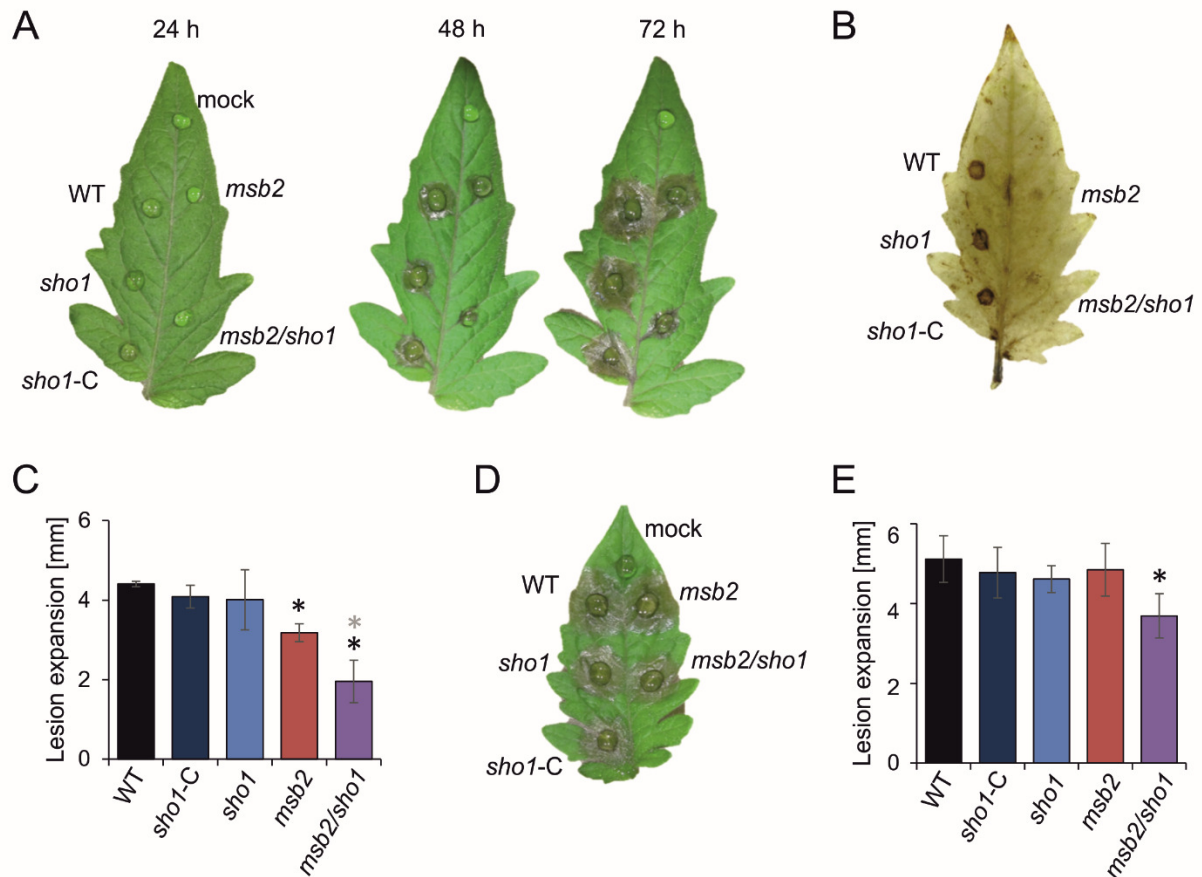
**Abb. 10: Vegetativer Wachstumstest/Stresstest im Vergleich zwischen *B. cinerea* Wildtyp und Mutanten.**

Verglichen wird jeweils das radiale Myzelwachstum des *B. cinerea* Wildtyps (WT) und der Mutanten *sho1*, *msb2*, *msb2/sho1*, sowie der *sho1* Komplementante (*sho1-C*) nach 72 h auf Agarplatten unterschiedlicher Medien. **(A)** Wachstum auf Gamborg-Minimalmedium mit 5 mM Glucose (GB5) bzw. 50 mM Glucose (GB50) und auf Malzextrakt-Vollmedium (ME). **(B)** Relatives Wachstum unter Stressbedingungen in % zum Kontrollmedium GB5 (NaCl, Sorbitol, Calcoflour white, Kongorot) bzw. GB50 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind gekennzeichnet (p<0.05:\*; p<0.01:\*\*; p<0.001:\*\*\*).

#### 4.1.3 Die *sho1* Mutante zeigt keine Virulenzdefekte

Die *msb2* Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine lediglich verzögerte, jedoch normale Infektion (Leroch *et al.*, 2015; Abb. 11A). Die Inokulation mit *sho1* Mutanten führte zu Primärläsionen und einer Läsionsausbreitung ähnlich der des Wildtyps (Abb. 11A,C). *msb2/sho1* Doppelmutanten zeigten wie *msb2* nach 24 h verspätete Primärläsionen, reduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion und eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte Läsionsausbreitung nach späteren Zeitpunkten (Abb. 11A,B). Zusätzlich infizierten Doppelmutanten die Tomatenblätter signifikant schlechter als die *msb2* Mutante (Abb. 11C). Dieser Virulenzdefekt konnte anders als bei *msb2* durch Verwundung des Blattes vor der Infektion nicht vollständig aufgehoben werden (Abb. 11D,E). Daraus kann geschlossen werden, dass ein additiver Effekt durch das Fehlen beider Sensorproteine die Läsionsausbreitung, nicht jedoch die Penetration beeinträchtigt. Die *sho1* Komplementante verhielt sich in allen phänotypischen Analysen wie der Wildtyp und bestätigt damit die Deletion von *sho1* als Ursache für den gezeigten Phänotyp (Abb. 9-11).

## Ergebnisse



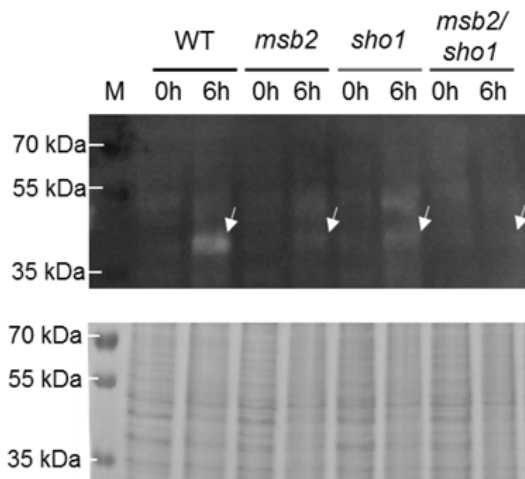
**Abb. 11: Infektion von Tomatenblättern durch *B. cinerea* Wildtyp und Mutanten.**

(A) Läsionsbildung im Zeitverlauf auf Tomatenblättern. (B) Die Färbung mit DAB nach 24 h visualisiert die Bildung von  $H_2O_2$  im Tomatenblatt. (C) Radiale Läsionsausbreitung nach 72 h auf Tomatenblättern. (D) Läsionsbildung und (E) radiale Läsionsausbreitung auf verwundeten Tomatenblättern (72 h). Signifikante Unterschiede zum Wildtyp (WT) sind mit schwarzen, Unterschiede zur *msb2* Mutante mit grauen Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0.05$ :\*).

### 4.1.4 Sho1 hat weniger Einfluss auf die BMP1-Aktivierung als Msb2

Es konnte bereits gezeigt werden, dass während der Keimung auf harten Oberflächen die Phosphorylierung von BMP1 in Abwesenheit von Msb2 deutlich reduziert ist, und dass ein Großteil der durch die BMP1-MAP-Kinase regulierten Gene auch in *msb2* Mutanten unterexprimiert sind (Leroch *et al.*, 2013; 2015). Damit reguliert Msb2 die Oberflächenerkennung und Penetration der Wirtspflanze über die BMP1-MAPK-Kaskade. Im Gegensatz dazu wurde für *sho1* Mutanten lediglich eine geringe Reduzierung der BMP1-Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Doppelmutanten in *msb2/sho1* zeigten ebenfalls eine deutlich verringerte BMP1-Phosphorylierung, die in mehreren biologischen Replikaten tendenziell als noch schlechter als bei *msb2* Deletion eingeschätzt wurde (Abb. 12). Damit wurde gezeigt, dass unter der analysierten *in vitro* Bedingung das putative Sensorprotein Sho1 nur einen sehr geringen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade hat, aber dennoch gemeinsam mit Msb2 die Phosphorylierung von BMP1 beeinflussen kann.

## Ergebnisse



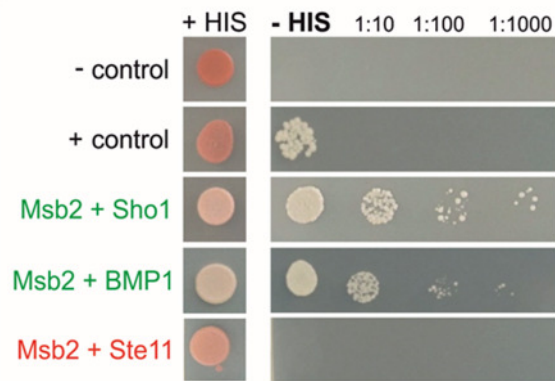
**Abb. 12: BMP1-Phosphorylierungsstudie in *B. cinerea* Wildtyp und Mutanten.**

Phosphorylierung von BMP1 in *B. cinerea* Wildtyp (WT), *msb2*, *sho1* und *msb2/sho1* Mutanten in ruhenden Sporen (0 h) und Keimlingen (6 h) in Apfelwachs-beschichteten Petrischalen. Als primärer Antikörper diente Phospho-p44/42, als sekundärer Antikörper Anti-Rabbit IgG. Durchgeführt durch J. Werner.

### 4.1.5 Y2H-Interaktionen der *B. cinerea* Sensorproteine Msb2 und Sho1

Eigene Vorarbeiten konnten mithilfe von Yeast two-hybrid Analysen (Y2H) nach dem Split-Ubiquitin System Protein-Interaktionen zwischen den Komponenten der Ste11-Ste7-BMP1-MAPK-Kaskade in *B. cinerea* validieren (Müller, 2012). Im Rahmen dieser Dissertation wurden zusätzliche Interaktionen verschiedener Proteine mit den Sensorproteinen Msb2 und Sho1 analysiert. Dazu wurde die codierende Sequenz der 78 C-terminalen Aminosäuren von Msb2, bzw. die gesamte für Sho1 codierende Sequenz in verschiedene Bait-Vektoren und einen Prey-Vektor kloniert und in Hefe jeweils mit anderen Bait/Prey-Konstrukten kotransformiert. Damit wurde eine Interaktion der Proteine Msb2 und Sho1 nachgewiesen, wie sie bereits in *S. cerevisiae* gezeigt wurde (Abb. 13; Cullen *et al.*, 2004). Allerdings konnte diese Interaktion beim Austausch von Bait- und Prey Vektor nicht verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion von Msb2 mit BMP1 wurde ebenfalls dokumentiert, aber auch diese war nur mit Msb2 als Bait-Protein positiv (Abb. 13). Interaktionsexperimente von Sho1 mit BMP1 waren ebenfalls negativ (Daten nicht gezeigt). Die Proteine Ste50, Ste11 und Ste7 wurden in die Analyse mit einbezogen, es konnte aber keine Interaktion dieser Komponenten der BMP1-MAPK-Kaskade mit Sho1 oder Msb2 gezeigt werden (Abb. 13; Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse



**Abb. 13: Yeast two-hybrid Protein-Interaktionen des *B. cinerea* Sensorproteins Msb2.**

Hefetransformanten mit dem Bait-Konstrukt Msb2-CT und dem Prey-Konstrukt Sho1, BMP1 oder Ste11, wurden in unterschiedlichen Verdünnungen auf SC-Platten getropft (+HIS). Das Wachstum auf Histidin-freiem Agar (-HIS) beweist durch die *his3* Reporter-gen-Aktivität die Interaktion (grün gekennzeichnet).

### 4.1.5.1 Screening einer cDNA-Bibliothek auf Msb2-Interaktionspartner

Um neue molekulare Komponenten und Interaktionspartner von Msb2 zu identifizieren, wurde zusätzlich zu gezielten Interaktionsstudien eine cDNA-Datenbank mithilfe des Split Ubiquitin Yeast two-hybrid Systems nach Interaktionspartnern durchsucht. Diese Bibliothek enthält cDNAs des Wildtyp Stamms B05.10 von auf Apfelwachsplatten gekeimten Sporen, sowie aus verschiedenen Infektionsstadien auf Bohne. Für zwei der insgesamt 78 mit dem C-Terminus von Msb2 als Bait „gefischten“ Klone konnte eine sehr starke direkte Interaktion mit Msb2 bestätigt werden (Abb. Anhang 2). Bei einem der cDNA-Klone handelte es sich um ein Protein unbekannter Funktion mit einer N-terminalen Cardiolipin Synthase Domäne (Bcin11g02030). Die Deletion dieses Gens (*cls-N* genannt) in *B. cinerea* führte zu keinerlei phänotypischen Unterschieden zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls verifiziert wurde die Msb2-Interaktion einer stark konservierten Rab-GTPase (Bcin07g03030) deren Ortholog YPT1 in Hefe den Export von Proteinen vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat reguliert und eine Rolle im sekretorischen Signalweg und der Autophagie spielt (Lipatova *et al.*, 2013). Von einer Deletion dieses Proteins in *B. cinerea* wurde jedoch abgesehen, da gezeigt wurde, dass die Deletion beider Allele des Gens in *C. albicans* letal war (Lee *et al.*, 2001).

## 4.2 Funktionelle Analyse keimungs- und BMP1-regulierter Gene

Bisher ist unklar welche von BMP1 beeinflussten Zielgene/-proteine den gravierenden Phänotyp der *bmp1* Mutante verursachen. Der Transkriptionsfaktor Ste12 agiert unterhalb der MAPK-Kaskade. *B. cinerea ste12* Deletionsmutanten bildeten wie *bmp1* keine Sklerotien und ähnelten mit einer verzögerten Infektion aufgrund von Penetrationsdefekten eher der *msb2* Mutante. Im Gegensatz zu *msb2* und *bmp1*, bei denen keine Appressorien gebildet wurden, konnten jedoch bei *ste12* Mutanten deformierte Appressorien ohne Funktion beobachtet werden (Schamber *et al.*, 2010). Eindeutig durch BMP1 (und teilweise zusätzlich durch Msb2 und/oder Ste12) regulierte Gene wie das für ein sekretiertes Protein codierende *gas2* (Schamber *et al.*, 2010) oder der Transkriptionsfaktor *rum1* (Leroch *et al.*, 2013) zeigten keinen Wachstums-, Keimungs- oder Virulenzdefekt.

Es wurden zwölf weitere Gene für die Mutagenese in *B. cinerea* ausgewählt. Alle waren im Vergleich zum Wildtyp in *bmp1* Mutanten herunterreguliert und zeigten eine verstärkte Genexpression während der Keimung (Leroch *et al.*, 2013). Drei der ausgeschalteten Gene (*plc1*, *cel1*, *af1*) codieren für sekretierte Zellwand abbauende Enzyme. Diese zeigten zusätzlich zur Regulation in *bmp1* und *msb2* Mutanten eine starke Expression im Wildtyp *in planta*, die mehr als zweifach stärker war als bei der Inkubation *in vitro*. Im Gegensatz dazu zeigten die Gene einer sekretierten Lysophospholipase (Lpl1) und der Chitin-Deacetylase Cda1 keine *in planta* Expression. Drei weitere sekretierte Proteine („germination induced secreted“ *gis1-3*) wiesen ebenfalls *in planta* nur sehr niedrige mRNA-Level auf. Sie codieren für ein Protein mit Cellulose-Bindedomäne (Gis1), ein Protein mit LysM-Domäne (Gis3) und ein Hydrophobin-ähnliches Protein (Gis2). Die Funktion dieser Proteine ist unbekannt, es könnte sich um sekretierte Effektorproteine handeln, die eine Rolle bei der Infektion spielen. *gis1* und *gis3* waren, wie die übrigen vier Gene, zusätzlich in *msb2* Mutanten während der Keimung herunterreguliert. Sie codieren für die beiden cytosolischen Proteine *gic1* und *gic2* (germination induced cytosolic), deren Expression *in planta* leicht induziert war, für das ebenfalls cytosolische Akyrin-repeat Protein *arp1*, sowie für das sehr große Membran-Protein *gim1* (germination induced membrane), welches keine Expression *in planta* aufwies (Tab. 2, Tab. Anhang 1).

Eigene Vorarbeiten verifizierten die direkte Interaktion zweier Proteine mit BMP1, die zusätzlich keimungsreguliert waren (Müller, 2012). Der putative NmrA Transkriptionsfaktor Bic8 ist in filamentösen Ascomyceten stark konserviert, und das codierende Gen wird während der späten Phase der Infektion in *B. cinerea* verstärkt exprimiert (Gioti *et al.*, 2006). Bic5 ist homolog zum menschlichen „Mannose-P-dolichol-utilization defect 1“-Protein, welches im Endoplasmatischen Retikulum für N-Glykosylierung zuständig ist (Hauptle und Hennet, 2009; Saudek *et al.*, 2012). Die Deletion des *bic5* Homologs in *M. oryzae* verursachte Defekte in der Differenzierung und Pathogenese (Zhang *et al.*, 2011). Um die



## Ergebnisse

Funktion dieser beiden Proteine zu analysieren wurden *bic5* und *bic8* ebenfalls für die Deletion in *B. cinerea* ausgewählt (Tab. 2, Tab. Anhang 1).

**Tab. 2: Übersicht der zur Analyse der BMP1-MAPK-Kaskade in *B. cinerea* deletierten keimungsregulierten Gene.**

Zellwand-abbauende Enzyme sind grün, andere lytische Enzyme rot, putative Effektorproteine gelb und nicht sekretierte Proteine in Blautönen markiert. TMD: Transmembrandomäne.

Name	Putative function	Protein size	Secreted	TMD	Germination induced	In planta expression	Downregulation in mutants	
							<i>bmp1</i>	<i>msb2</i>
<i>bic5</i>	Mannose-P-dolichol utilization protein	297 aa	no	4	yes	weak	no	no
<i>bic8</i>	NmrA-like transcription factor	320 aa	no	0	yes	weak	no	no
<i>plc1</i>	Pectate lyase C	384 aa	yes	0	yes	strong	yes	yes
<i>cel1</i>	Cellulase (Glyco_hydro_7)	599 aa	yes	0	yes	strong	yes	yes
<i>af1</i>	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	320 aa	yes	0	yes	strong	yes	yes
<i>lpl1</i>	Lysophospholipase (fungal phospholipase B)	642 aa	yes	0	yes	no	yes	no
<i>cda1</i>	Chitin deacetylase (4 chitin binding domains)	615 aa	yes	0	yes	no	yes	no
<i>gis1</i>	Unknown function (Cellulose binding domain CBM-1)	574 aa	yes	6	yes	weak	yes	yes
<i>gis2</i>	Cys-rich hydrophobin-like protein	234 aa	yes	0	yes	weak	yes	no
<i>gis3</i>	LysM domain containing protein	239 aa	yes	0	yes	no	yes	yes
<i>gic1</i>	Aldo-ketoreductase	337 aa	no	0	yes	weak	yes	yes
<i>gic2</i>	Unknown function (DUF4336), conserved protein	276 aa	no	0	yes	strong	yes	yes
<i>gim1</i>	Unknown function (large membrane protein)	2656 aa	no	6	yes	no	yes	yes
<i>arp1</i>	Ankyrin-repeat containing protein (3 ankyrin repeats)	220 aa	no	0	yes	medium	yes	yes

Für die Mutagenese wurden die codierenden Sequenzen der Zielgene durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Es konnten echte Deletionsmutanten für alle Gene verifiziert und mittels Einzelsporenisolation zu homokaryotischen Stämmen, die keine Wildtypkerne mehr enthielten, aufgereinigt werden. Auffällig war, dass das Verhältnis zwischen echten Mutanten und der ektopischen Integration des KO-Konstrukts stark schwankte (Tab. 3). Auch die Transformationseffizienz und die benötigten Wiederholungen der Einzelsporenisolation war von den Konstrukten abhängig (Daten nicht gezeigt). Charakterisiert wurden das vegetative radiale Wachstum auf verschiedenen Medien, die Sporen- und Sklerotienbildung und die Keimung auf verschiedenen Oberflächen bei unterschiedlicher Zuckerverfügbarkeit. Die Differenzierung von Appressorien und infection cushions, sowie die Läsionsbildung auf Tomatenblättern wurden ebenfalls analysiert. Lediglich das Ausschalten des Ankyrin-repeat Proteins *arp1* führte zu Defekten, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, während sich die homokaryotischen KO-Mutanten der übrigen keimungsregulierten Gene in keinem der Experimente vom Wildtyp unterschieden (Tab. 3).

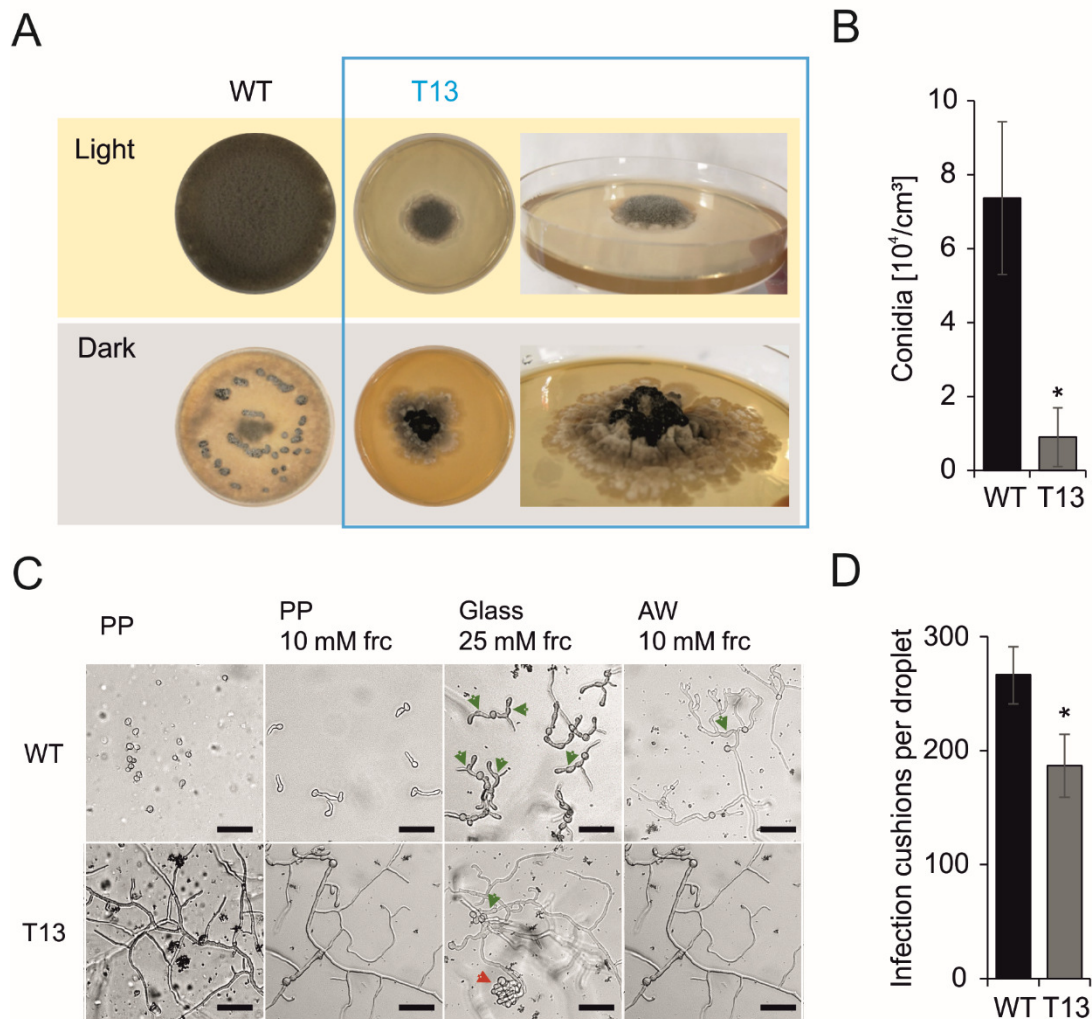
## Ergebnisse

**Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung der KO-Mutanten keimungsregulierter Gene.**

Dargestellt sind Werte einer repräsentativen homokaryotischen Deletionsmutante im Vergleich zum *B. cinerea* Wildtyp (WT). GB5: Gamborg-Minimalmedium mit 5 mM Glucose, ME: Malzextrakt-Vollmedium.

Name	No. of transformants		Radial growth 72 h				Conidia	Germination	Sclerotia	Appressoria	Infection cushions	Lesion expansion 72 h	
	True k.o.	Ectopic	GB5	ME									
<i>bic5</i>	3	5	89% ± 1%	101% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	97% ± 2%	
<i>bic8</i>	12	11	97% ± 1%	104% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	102% ± 2%	
<i>plc1</i>	1	5	95% ± 1%	97% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	96% ± 2%	
<i>cel1</i>	2	11	101% ± 1%	100% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	95% ± 2%	
<i>af1</i>	4	27	101% ± 1%	98% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	100% ± 2%	
<i>lpl1</i>	4	4	97% ± 1%	94% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	98% ± 2%	
<i>cda1</i>	2	2	102% ± 1%	90% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	98% ± 2%	
<i>gis1</i>	11	25	91% ± 1%	99% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	96% ± 2%	
<i>gis2</i>	4	17	100% ± 1%	99% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	99% ± 2%	
<i>gis3</i>	9	19	99% ± 1%	98% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	103% ± 2%	
<i>gic1</i>	5	0	96% ± 1%	99% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	97% ± 2%	
<i>gic2</i>	3	10	103% ± 1%	101% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	99% ± 2%	
<i>gim1</i>	1	12	97% ± 1%	99% ± 1%	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	96% ± 2%	
<i>arp1</i>	7	12	34% ± 1%	45% ± 1%	Strongly reduced	Aberrant differentiation	Aberrant	Aberrant differentiation	Aberrant	Aberrant differentiation	Aberrant differentiation	45% ± 2%	

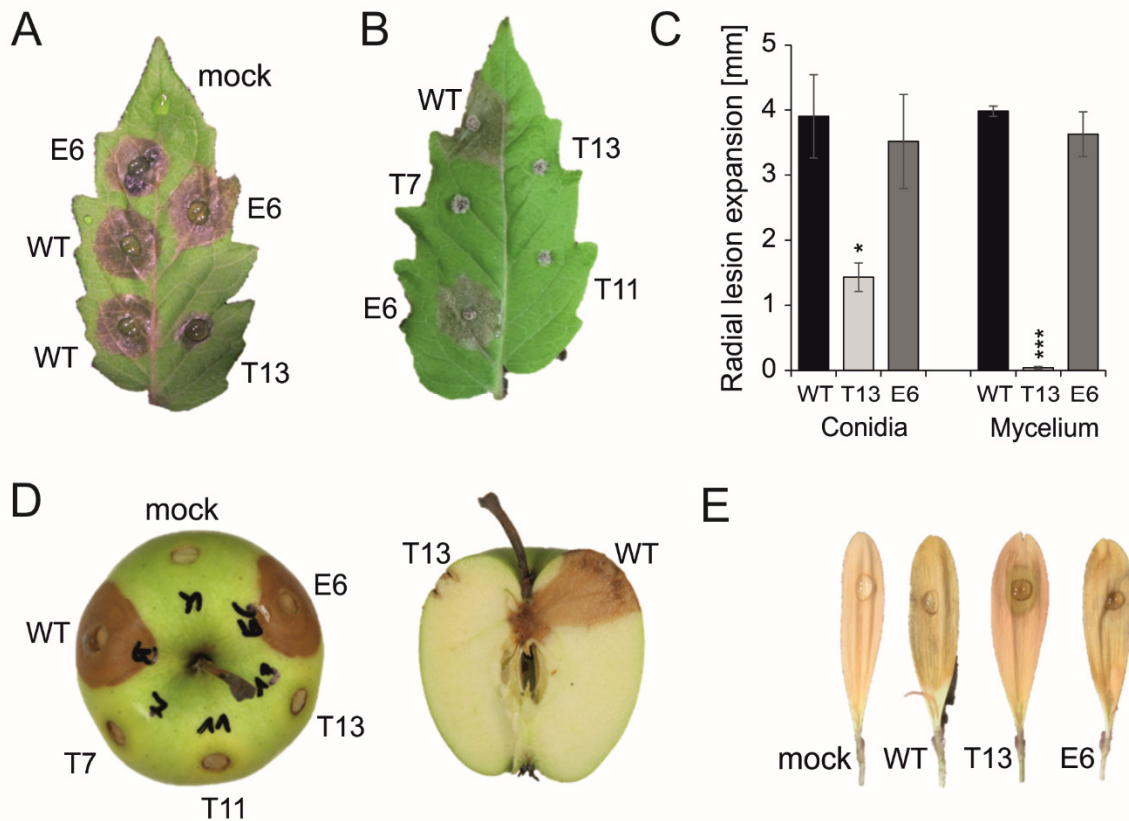
Insgesamt wurden sieben unabhängige *arp1* Mutanten verifiziert, während zwölf Transformanten das KO-Konstrukt ektopisch in die DNA integriert hatten. Die Einzelsporenisolation gestaltete sich aufgrund eines gravierenden Wachstumsdefekts äußerst schwierig, da immer wieder Revertanten mit der Wildtyp-Kopie des Gens die echten Mutanten überwucherten. Nach insgesamt 13 Runden Einzelsporenisolation konnten drei unabhängige *arp1* Mutanten (T7, T11, T13) phänotypisch analysiert werden. Alle drei zeigten dieselben Defekte, während sich die Transformanten mit ektopischer Integration wie der Wildtyp verhielten. Demnach wird davon ausgegangen, dass die Deletion von *arp1* tatsächlich die Ursache des Phänotyps ist, eine Komplementation des Gens steht jedoch noch aus. *arp1* Mutanten sind deutlich in der radialen Myzelausbreitung gehemmt (Tab. 3; Abb. 14A). Durch das reduzierte vegetative Wachstum bedeckte das Myzel der *arp1* Mutante nach vier Wochen bei Dunkelheit nur einen Teil der Agar-Platte, und es wurde ein einziges großes Sklerotium gebildet (Abb. 14A). Die Mutanten produzierten nur sehr wenige Sporen (Abb. 14B). Die Differenzierung von Hyphen und Appressorien nach 18 h auf Apfelwachs mit Zucker war Wildtyp-ähnlich. Nach der Keimung auf Glas oder Polypropylenfolie mit und ohne Zucker zeigten die *arp1* Mutanten eine gegenüber dem Wildtyp ungewöhnlich starke Hyphenbildung und Verzweigung (Abb. 14C, Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur Ausbildung vieler Appressorien durch den Wildtyp nach 18 h bildete die Mutante nur vereinzelt Appressorien, aber deutlich verfrüht (bereits nach 18 h) infection cushions. Diese waren größer als beim Wildtyp, wurden aber in geringerer Zahl gebildet (Abb. 14C,D).



**Abb. 14: Hyphenbildung und Differenzierung im Vergleich zwischen *B. cinerea* Wildtyp (WT) und der *arp1* Mutante (T13).**

(A) Die Inkubation auf Malzextrakt-Agar im Licht für 10 Tage, bzw. im Dunkeln für 4 Wochen führt zur Sporen- bzw. Sklerotienbildung beim Wildtyp. (B) Anzahl gebildeter Sporen 10 Tage nach dem Ausplattieren. (C) Keimung und Differenzierung von Hyphen (18 h). Pfeile markieren Beispiele für infection cushions (rot) und Appressorien (grün). Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m (D) Bildung von infection cushions nach 48 h auf Glas. Signifikante Abweichungen vom WT sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*).

Bei Inokulation mit Sporen wurden durch *arp1* Mutanten signifikant kleinere Sekundärläsionen auf Tomatenblättern und Gerbera-Petalen gebildet (Abb. 15A,C,E). Die Hemmung der radialen Expansion entsprach hierbei dem reduzierten vegetativen Wachstum (Abb. 15C, Tab. 3), weshalb hier nicht von einem eindeutigen Virulenzdefekt gesprochen werden kann. Bei Inokulation mit Myzel anstelle von Sporensuspension, konnte keine Infektion durch *arp1* Mutanten beobachtet werden (Abb. 15B,C). Bei Inokulation von Sporen auf verwundeten Äpfeln war *arp1* ebenfalls apathogen (Abb. 15D).



**Abb. 15: Infektionsphänotyp der *B. cinerea arp1* Mutante.**

Bildung und radiale Ausbreitung von Läsionen des *B. cinerea* Wildtyps (WT), unabhängiger *arp1* Mutanten (T7, T11, T13) und einer Transformante mit ektopischer Integration des *arp1*-KO-Konstrukts (E6) **(A)** Standard-Infektion von Tomatenblättern nach Inokulation mit Sporen (72 h). **(B)** Inokulation von Tomatenblättern mit Myzel. **(C)** Vergleich der radialen Läsionsausbreitung aus **(A)** und **(B)** nach 72 h. Signifikante Abweichungen vom WT sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,001$ :\*\*\*). **(D)** Mazeration von verwundeten Äpfeln nach Sporeninokulation (9 Tage). **(E)** Läsionsbildung auf Gerbera-Petalen nach Sporeninokulation (48 h).

## 4.3 Charakterisierung und vergleichende Analysen von *B. cinerea* VELVET-Mutanten

### 4.3.1 Erstellung verschiedener VELVET-Mutanten

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mutanten *lae1* und *vel1* (Schumacher *et al.*, 2012; 2015) wurden im Rahmen dieser Dissertation verschiedene weitere VELVET-Mutanten charakterisiert (vgl. Tab. 9). Obwohl eine *vel2* Mutante bereits analysiert worden ist (Yang *et al.*, 2012), wurde für die nachfolgenden detaillierteren Analysen eine *vel2* Deletionsmutante im häufiger verwendeten Laborstamm B05.10 erstellt. Zusätzlich wurde das Gen *vel3* ebenfalls in B05.10 ausgeschaltet. Das in dieser Arbeit deletierte *vel3* stellt das Ortholog zu *velC* in *A. nidulans* dar und wurde in Schumacher *et al.* (2012) ursprünglich als *vel4* bezeichnet. In die Analysen wurde zusätzlich eine zufällig entstandene Mutante mit einem verkürzten VEL1 Protein einbezogen, die einen für VELVET-Mutanten typischen Phänotyp aufwies. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

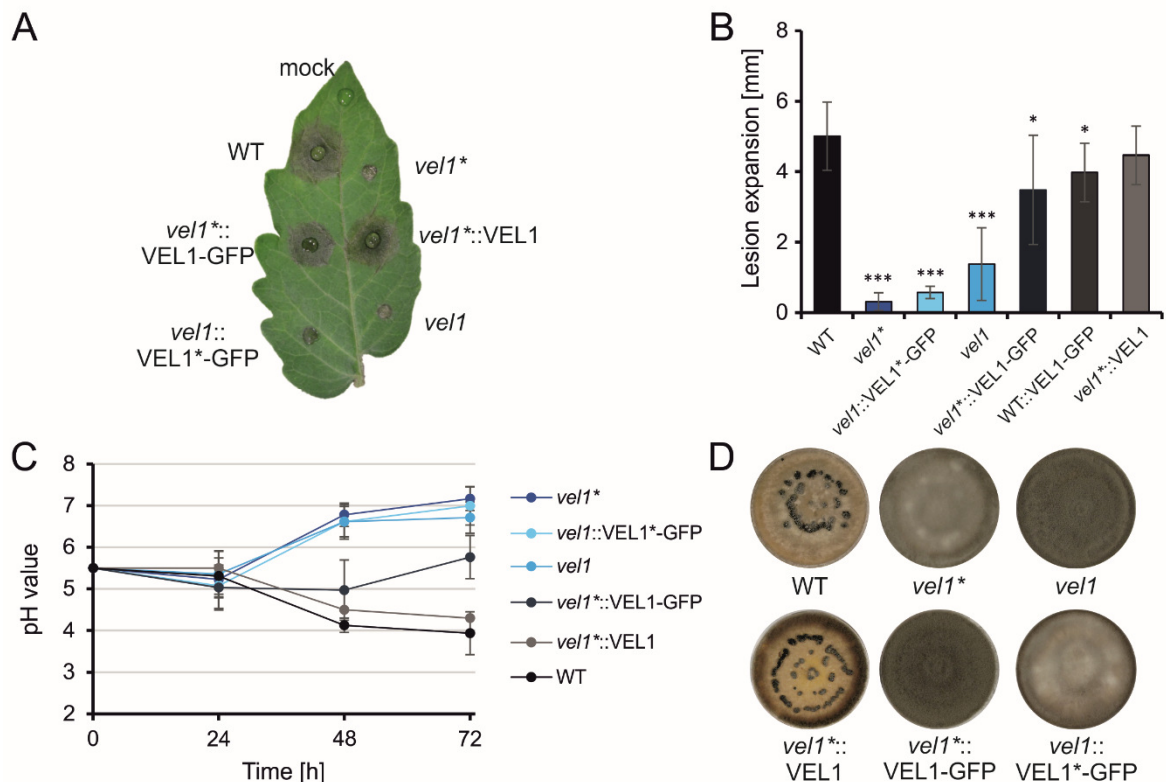
#### 4.3.1.1 Die *vel1\** Mutation verursacht einen VELVET-typischen Phänotyp

Bei der KO-Mutagenese des *sho1* Gens (vgl. Kapitel 4.1.1) wurden bei unterschiedlichen Transformationsansätzen 19 *B. cinerea* Mutanten verifiziert, in welchen *sho1* durch eine Hygromycin-Resistenzkassette unterbrochen wurde (Abb. Anhang 3A). Zusätzlich wurden drei Mutanten generiert, in denen durch Integration der Resistenzkassette die für *sho1* codierende Sequenz vollständig deletiert wurde (Abb. Anhang 3B). Alle diese Mutanten zeigten einen Phänotyp, welcher ähnlich zu dem bereits beschriebener VELVET-Mutanten war (vgl. Abb. 19; Schumacher *et al.*, 2012; 2015). Die Integration eines intakten *sho1* Komplementationskonstrukts *in loco* (*vel1\*::Sho1*, Abb. Anhang 3C) führte jedoch nicht zur Aufhebung der Virulenz- und Ansäuerungsdefekte (Abb. Anhang 4). Um auszuschließen, dass die Veränderung des 3'-genomischen Bereichs außerhalb der für *sho1* codierenden Region einen Einfluss hat, wurde das *sho1*-Komplementationskonstrukt zusätzlich in B05.10 transformiert. Die resultierenden Mutanten WT::*Sho1* verhielten sich in allen Analysen wie der Wildtyp (Abb. Anhang 4). Damit konnte gezeigt werden, dass der beobachtete VELVET-Phänotyp eine andere Ursache haben muss als die Inaktivierung von *sho1* oder die Veränderung der *sho1* flankierenden genomischen Region.

Bei einer näheren Analyse von RNAseq Transkriptomdaten wurde in einer der Insertionsmutanten von *sho1* eine zusätzliche Punktmutation im *vel1* Gen entdeckt. Diese führt zu einem Austausch in Basenpaar 1615 (C→T), was durch Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons die Bildung des um 37 Aminosäuren verkürzten Proteins VEL1<sup>1-538</sup> zur Folge hat. Durch die Mutation wird eine *AccI* Restriktionsschnittstelle in der Genomsequenz entfernt, sodass nach PCR dieses Abschnitts nur das Wildtyp-PCR Produkt geschnitten wird. Alle überprüften *sho1* Insertions- und Deletionsmutanten, die den

## Ergebnisse

VELVET-typischen Phänotyp zeigten, wiesen diese Mutation auf (Daten nicht gezeigt). Für weitere Analysen wurde die Insertions-Mutante KO9 benutzt, welche im Folgenden *vel1\** genannt wird. Um zu bestätigen, dass die Veränderung des VEL1-Proteins den Phänotyp verursacht, wurde die *vel1\** Mutante mit verschiedenen *vel1* Konstrukten komplementiert. Die Integration eines VEL1-GFP Fusionskonstrukts (*vel1\*::VEL1-GFP*, Abb. Anhang 3E) führte zur nahezu vollständigen Aufhebung des Virulenzdefekts und einer Ansäuerung des infizierten Gewebes (Abb. 16). Die Komplementante bildete jedoch weiterhin, wie für VELVET-Mutanten typisch, keine Sklerotien, und produzierte im Dunkeln große Mengen an Konidien. Die daraufhin durchgeführte *vel1 in loco* Komplementation der *vel1\** Mutante (*vel1\*::VEL1*, Abb. Anhang 3D) führte zur vollständigen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Ergänzend konnte der Phänotyp der *vel1\** Mutante durch Einbringen eines VEL1\*-GFP Konstrukts in die *vel1* Mutante erzeugt werden (Abb. 16; *vel1::VEL1\*-GFP*, Abb. Anhang 3F; die Mutante wurde von J. Schumacher zur Verfügung gestellt). Diese Untersuchungen bewiesen, dass die spontan aufgetretene Mutation (1615C→T) im Gen *vel1* für den VELVET-Phänotyp der *vel1\** Mutante verantwortlich ist, und dass *sho1* keinen Einfluss auf diese Effekte hat.



**Abb. 16: Komplementation der *vel1\** Mutante mit verschiedenen *vel1*-Konstrukten, sowie künstliche Erzeugung des *vel1\**-KO-Phänotyps durch Integration von VEL1\*-GFP.**

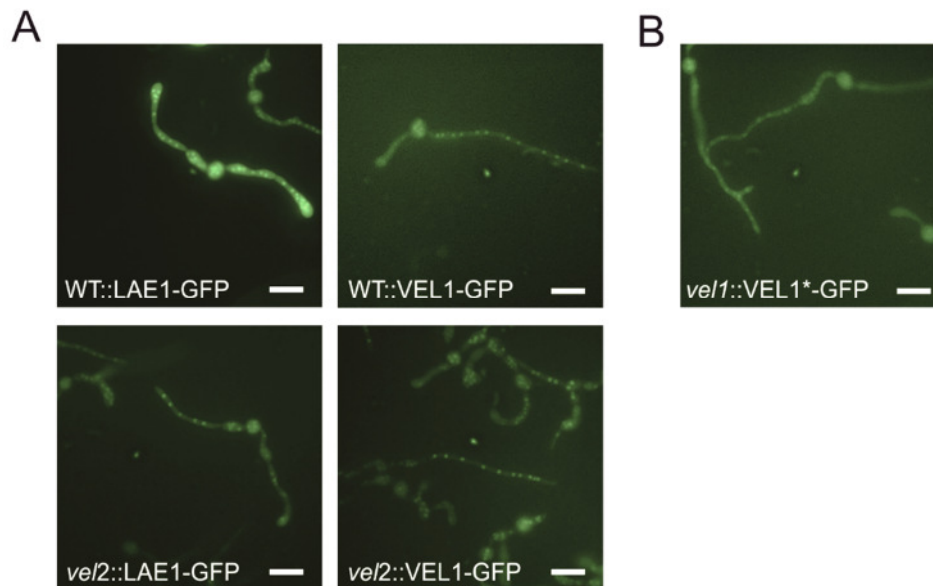
(A) Infektionsverhalten und (B) radiale Läsionsausbreitung auf Tomatenblättern (72 h). (C) pH-Verlauf während der Infektion. (D) Analyse der Sklerotienbildung auf Vollmedium nach 4 Wochen im Dunkeln bei 15°C. Die Inokulation erfolgte mit Tropfen von  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in Minimalmedium mit 25 mM Glucose (A, B, C), bzw. in Wasser (D). Signifikante Abweichungen vom WT in (B) sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,001$ :\*\*\*).

#### 4.3.1.1 Komplementation der *vel2* Mutante

Zur Bestätigung des Phänotyps der neuen *vel2*-Mutante wurde die Mutante *vel2::VEL2-GFP* durch Integration eines bereits beschriebenen VEL2-GFP Konstrukts (Schumacher *et al.*, 2015) erzeugt. Zusammen mit dem Stamm WT::VEL2-GFP (Schumacher *et al.*, 2015) als Kontrollstamm wurde diese phänotypisch charakterisiert und mit *vel2* verglichen. Das VEL2-GFP Fusionsprotein zeigte seine Funktionalität durch die komplette Aufhebung der für *vel2* beobachteten Wachstums-, Virulenz-, Ansäuerungs- und Differenzierungsdefekte (Abb. Anhang 5, vgl. Kapitel 4.3.3-6). Während die Sklerotienbildung in *vel2::VEL2-GFP* der des Wildtyps ähnelte, wurde für WT::VEL2-GFP die zusätzliche Bildung asexueller Konidien im Sklerotieninduktionstest beobachtet (Abb. 5E Anhang). Die Lokalisierung von VEL2-GFP in der *vel2* Mutante war identisch zu der im Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.2 Die Lokalisierung der VELVET-Proteine ist unabhängig von VEL2, VEL1\* zeigt eine Kernlokalisierung

In vorangehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass GFP-markierte Versionen der Proteine VEL1 und LAE1 hauptsächlich im Nukleus lokalisiert sind, während VEL2-GFP zusätzlich im Cytosol zu sehen ist. Die Lokalisierung der untersuchten Proteine war in *vel1* und *lae1* Mutanten gegenüber dem Wildtyp unverändert (Schumacher *et al.*, 2015). Um den Einfluss der *vel2* Deletion auf VEL1- und LAE1-Lokalisierung zu untersuchen, wurde die *vel2* Mutante mit bereits zuvor verwendeten VEL1- und LAE1-GFP Konstrukten (Schumacher *et al.*, 2015) transformiert. Die daraus resultierenden Stämme *vel2::VEL1-GFP* und *vel2::LAE1-GFP* zeigten wie im Wildtyp eine Kernlokalisierung von VEL1 und LAE1 (Abb. 17A). Die um 37 Aminosäuren leicht verkürzte VEL1\*-Variante im bereits beschriebenen Stamm *vel1::VEL1\*-GFP* war wie das native VEL1 im Kern lokalisiert (Abb. 17B). An- oder Abwesenheit von Licht hatte keinerlei Einfluss auf die Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 17: Lokalisierung von VELVET-Komplex Proteinen in Wildtyp, *vel1* oder *vel2* Mutante.** C-terminal mit GFP fusionierte Proteine wurden mittels des konstitutiven *A. nidulans oliC* Promotors in den Mutanten überexprimiert. **(A)** VEL1- und LAE1-GFP im Wildtyp (WT) und *vel2*. **(B)** VEL1\*-GFP in *vel1*. Sporen wurden auf Glas in GB5 Minimalmedium mit 25 mM Glucose für 16 h in Dunkelheit inkubiert. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m.

### 4.3.3 Der VELVET-Komplex beeinflusst vegetatives Wachstum und lichtabhängige Differenzierung

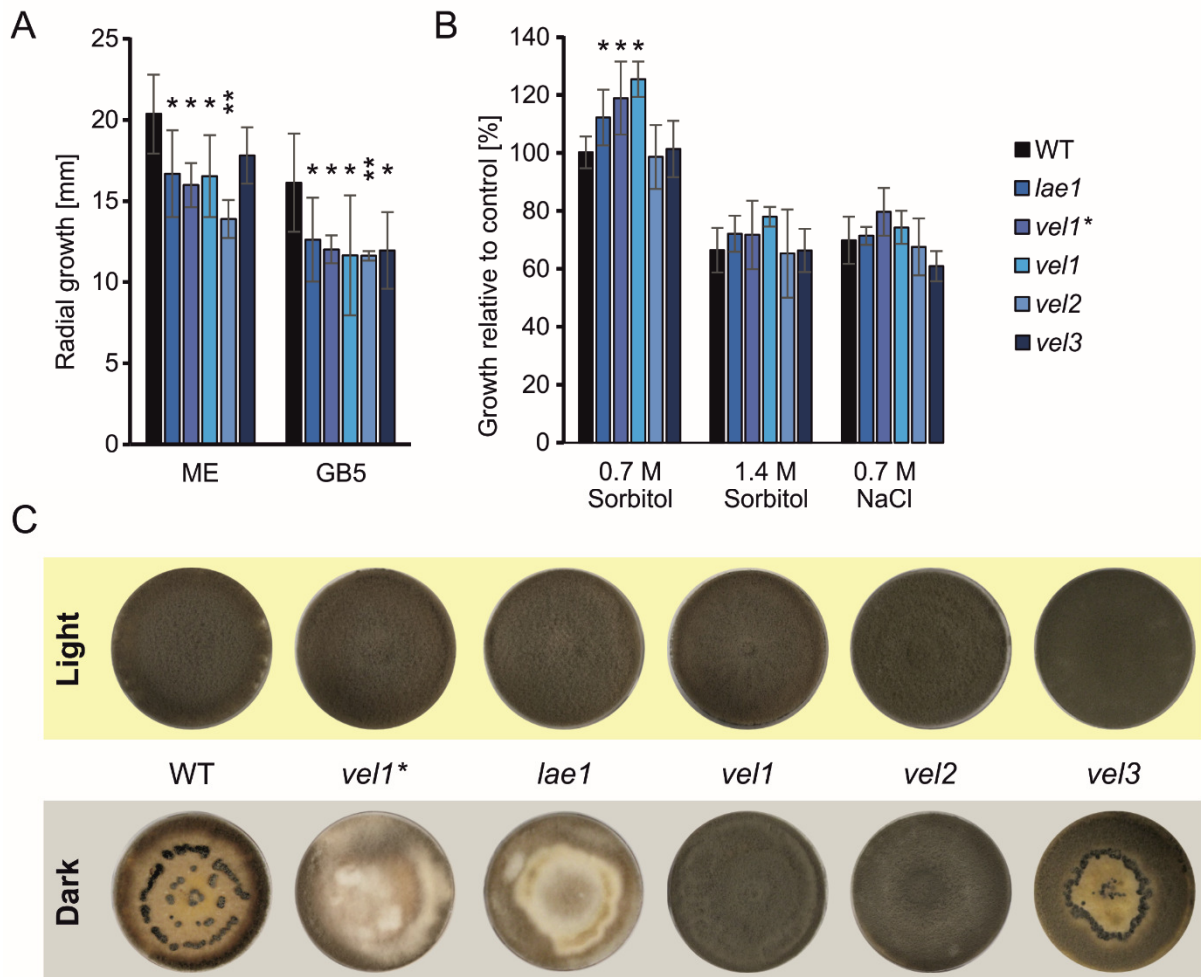
Das radiale Wachstum der fünf verschiedenen VELVET-Mutanten war nach drei Tagen auf Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert. Auf Vollmedium war das Wachstum der *vel3* Mutante nur tendenziell schwächer, die übrigen Mutanten zeigten etwas schlechteres Wachstum, wobei die *vel2* Mutante am stärksten beeinträchtigt war (Abb. 18A). Osmotischer Stress oder Salzstress hemmte das Wachstum aller Mutanten und des Wildtyps gleich stark (Abb. 18B; 1,4 M Sorbitol/ 0,7 M NaCl). Eine osmotische Stabilisierung des Mediums (0,7 M Sorbitol) verbesserte das Wachstum der Mutanten *lae1*, *vel1\** und *vel1* signifikant im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18B). Die Zugabe von 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte nur bei *vel1\** und *lae1* und ausschließlich bei Licht-Dunkel-Inkubation zu einer im Vergleich zu anderen Stämmen deutlicheren Inhibierung des Wachstums (Daten nicht gezeigt). Auf Agarplatten zeigten alle Stämme ein Wachstumsoptimum bei pH 5,5, während hohe (pH 7, pH 9) und niedrige (pH 3) pH-Werte das Wachstum inhibierten. Die Empfindlichkeit gegenüber alkalischen Wachstumsbedingungen war hier für die Mutanten *lae1*, *vel1\**, *vel1* und *vel2* im Vergleich deutlich stärker ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

Bei Wachstum im Licht produzierten alle Stämme nach 10 Tagen große Mengen asexueller Konidien. Nach vierwöchiger Inkubation im Dunkeln bildeten ausschließlich der Wildtyp und die *vel3* Mutante Sklerotien, wobei *vel3* Deletionsmutanten zusätzlich auch Sporen produzierten. Die Mutanten *vel1* und *vel2* zeigten mit starker lichtunabhängiger Konidienbildung den bereits zuvor beschriebenen „always conidia“-Phänotyp (Schumacher



## Ergebnisse

*et al.*, 2012, 2015), während *lae1* und *vel1\** nur vereinzelt Konidien, jedoch stark ausgeprägtes cremefarbenes Luftmyzel produzierten (Abb. 18C). Damit kann festgehalten werden, dass die Deletion/Veränderung von VELVET-Proteinen unterschiedliche Ausprägungen einer gestörten Regulation der lichtabhängigen sexuellen Entwicklung zur Folge hat, der Einfluss von VEL3 ist dabei aber gering.



**Abb. 18: Vegetatives Myzelwachstum und lichtabhängige Differenzierung des *B. cinerea* Wildtyps (WT) und verschiedener VELVET-Mutanten auf Agarplatten.**

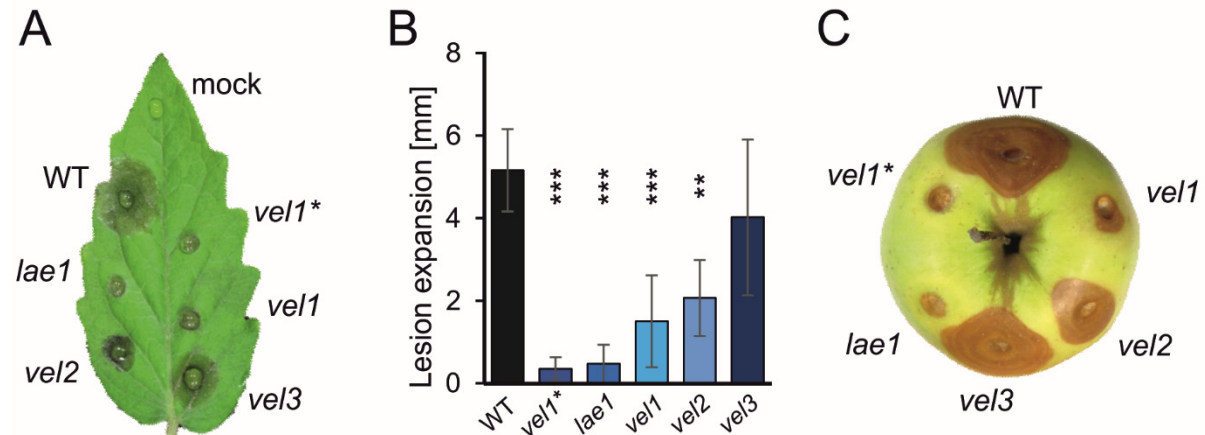
(A) Radiales Myzelwachstum auf Malzextrakt-Vollmedium (ME) und Gamborg Minimalmedium mit 5 mM Glucose (GB5). (B) Relatives radiales Wachstum bei osmotischer Stabilisierung (0,7 M Sorbitol), unter osmotischem Stress (1,4 M Sorbitol) und Salzstress (0,7 M NaCl) im Vergleich zur Kontrolle auf GB5. (C) Auf ME nach 10 Tagen im Licht bei 20°C ist die Sporenbildung aller Stämme gezeigt, während die Bildung von Sklerotien bei 15°C in Dunkelheit nach vier Wochen nur beim WT und der *vel3* Mutante erfolgt. Signifikante Abweichungen vom WT sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*).

### 4.3.4 Die Läsionsausbreitung ist in VELVET-Mutanten stark reduziert

Im Infektionstest zeigte der Vergleich der verschiedenen VELVET-Mutanten mit dem Wildtyp eine Abstufung der Defekte auch zwischen den Mutanten. Während *vel1\** und *lae1* auf Tomatenblättern fast ausschließlich Primärläsionen verursachten, bildete *vel1* in manchen Versuchsdurchläufen langsam expandierende Sekundärläsionen. *vel2* Mutanten waren

## Ergebnisse

nahezu immer in der Lage Sekundärläsionen zu bilden, die jedoch im Vergleich zum Wildtyp kleiner blieben. Die Deletion von *vel3* führte zu keiner signifikanten Verringerung der Läsionsausbreitung (Abb. 19A,B). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Inokulation verwundeter Äpfel, Gerbera-Blütenblättern und *Phaseolus* Blättern erzielt (Abb. 19C, Daten nicht gezeigt).



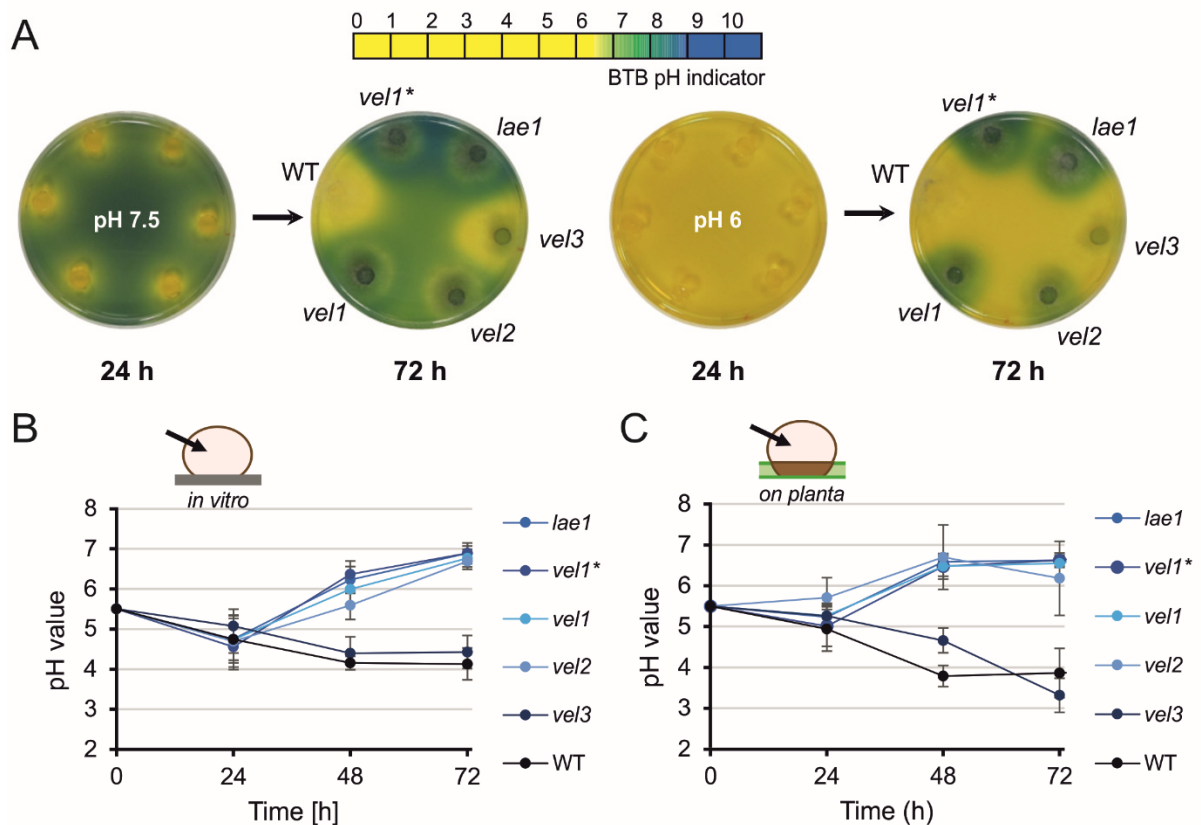
**Abb. 19: Infektionsphänotyp der VELVET-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT).**

(A) Läsionsbildung und (B) radiale Läsionsausbreitung 72 h auf Tomatenblättern. (C) Expansion der Läsion in verwundetem Apfelfgewebe. Signifikante Abweichungen vom WT sind gekennzeichnet ( $p < 0,01$ :\*\*;  $p < 0,001$ :\*\*\*).

### 4.3.5 VELVET-Mutanten zeigen eine veränderte pH-Modulation und Sekretion organischer Säuren

Wie bereits beschrieben ist *B. cinerea* in der Lage seine Umgebung aktiv anzusäuern. Auf Minimalmedium (pH 7,5) konnte mithilfe des pH-Indikators Bromthymolblau (BTB) gezeigt werden, dass der Wildtyp und die *vel3* Mutante den Agar bereits nach 24 h aktiv auf unter pH 6 ansäuerten. Die Mutanten *lae1*, *vel1\**, *vel1* und *vel2* zeigten eine transiente Azidifizierung nach 24 h, alkalisierten danach jedoch das Medium. Im gleichen Test mit einem niedrigeren Ausgangs-pH (pH 6) zeigte sich umso deutlicher die Alkalisierung durch die Mutanten außer durch *vel3* (Abb. 20A). pH-Messungen in Inokulationstropfen ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) auf künstlicher Oberfläche und während der Infektion lieferten ähnliche Ergebnisse (Abb. 20B,C). Da sich die *vel3* Mutante auch im Ansäuerungsverhalten wie der Wildtyp verhielt, wurde sie nicht in alle weiteren Analysen miteinbezogen.

## Ergebnisse



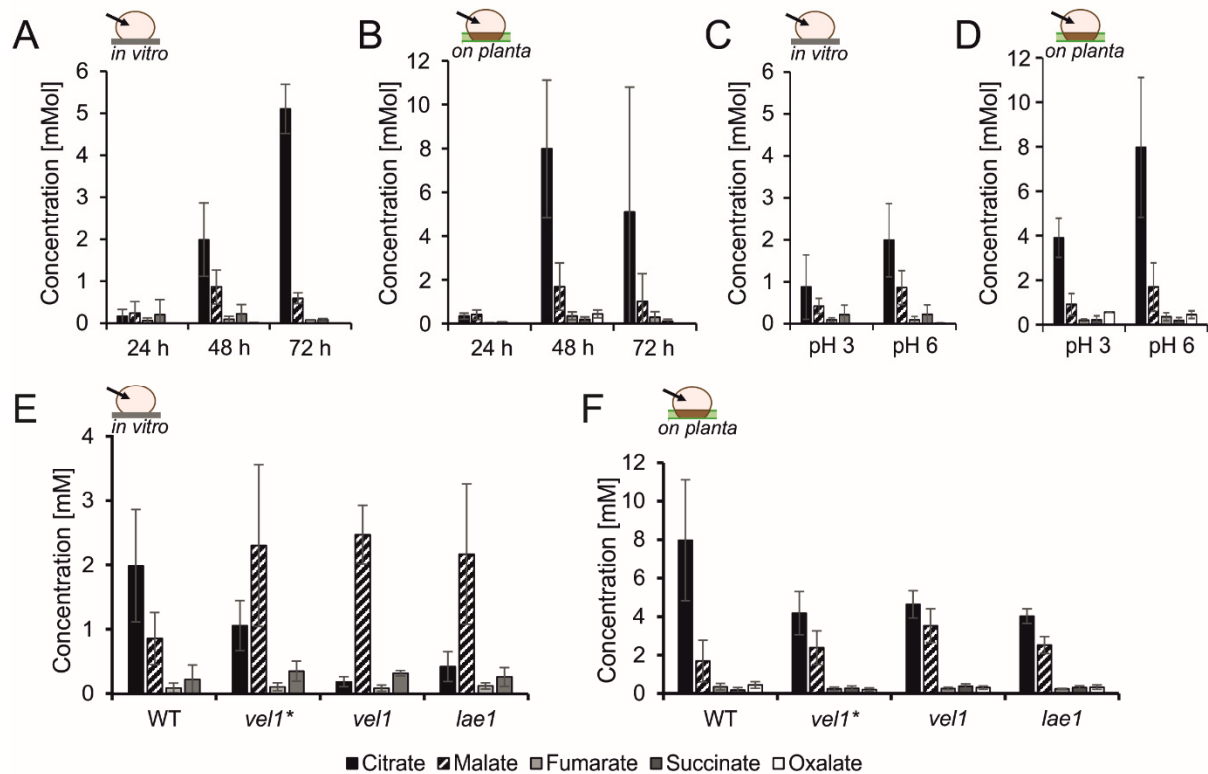
**Abb. 20: Modifikation des externen pH-Werts durch *B. cinerea* Wildtyp und VELVET-Mutanten.**

(A) Visualisierung der pH-Änderung auf Minimalmedium-Agarplatten mit dem pH-Indikator Bromthymolblau (BTB). (B, C) pH-Änderung nach 48 h *in vitro* auf Polypropylenfolie (B) und *on planta* auf Tomatenblättern (C).

Die Ansäuerung durch *B. cinerea* wurde bisher mit der Sekretion von Oxalat in Verbindung gebracht (Kunz *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2015). Während der ersten drei Tage der Inokulation des Wildtyps in Tropfen auf Polypropylenfolie (*in vitro*) war Citrat die dominierende organische Säure, gefolgt von Malat und sehr geringen Mengen Fumarat und Succinat. Citrat zeigte eine Akkumulation im Zeitverlauf, während die Menge an Malat von 48 h auf 72 h rückläufig war. Es konnte bis 72 h kein Oxalat nachgewiesen werden (Abb. 21A). Während der Infektion von Tomatenblättern konnte ein ähnliches Sekretionsmuster beobachtet werden, wobei die gemessenen Mengen organischer Säuren insgesamt deutlich höher waren (Abb. 21B). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Sekretion der Säuren vom initialen pH der Inokulationstropfen abhängig war: Bei höherem pH (pH 6) wurden mehr Säuren sekretiert als bei pH 3 (Abb. 21C,D). Im Vergleich zum Wildtyp sekretierte *vel1\** *in vitro* deutlich weniger Citrat als Malat, *vel1* und *lae1* nur sehr wenig Citrat und ebenfalls viel Malat (Abb. 21E). Bei Inokulation auf Tomatenblättern bildeten die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp tendenziell ebenfalls mehr Malat, obgleich wie bei Inokulation mit dem Wildtyp mehr Citrat als Malat gemessen wurde. Die Ergebnisse während der Infektion sind durch Säuren aus der Pflanze beeinflusst, wie z.B. Spuren von Oxalat in der Probe einer Oxalat-defizienten *oahA* Mutante zeigen (Abb. 21F, vgl. Abb. 22D).

## Ergebnisse

Insgesamt betrachtet kann die fehlende Ansäuerung durch die VELVET-Mutanten *lae1*, *vel1\** und *vel1* nicht mit der Sekretion organischer Säuren korreliert werden, die deutlich geringeren Mengen Citrat scheint dabei jedoch von Bedeutung zu sein. In einem weiteren Test wurde beobachtet, dass der Wildtyp 72 h im Vergleich zu den Mutanten *vel1\**, *lae1* und *vel1* zusätzlich größere Mengen Ammonium produzierte (Daten nicht gezeigt). Die Alkalisierung durch Mutanten kann daher nicht mit einer verstärkten Sekretion von Ammonium erklärt werden, wie es für andere Pilze gezeigt wurde (Alkan *et al.*, 2008).



**Abb. 21: Sekretion organischer Säuren durch *B. cinerea* Wildtyp und VELVET-Mutanten.**

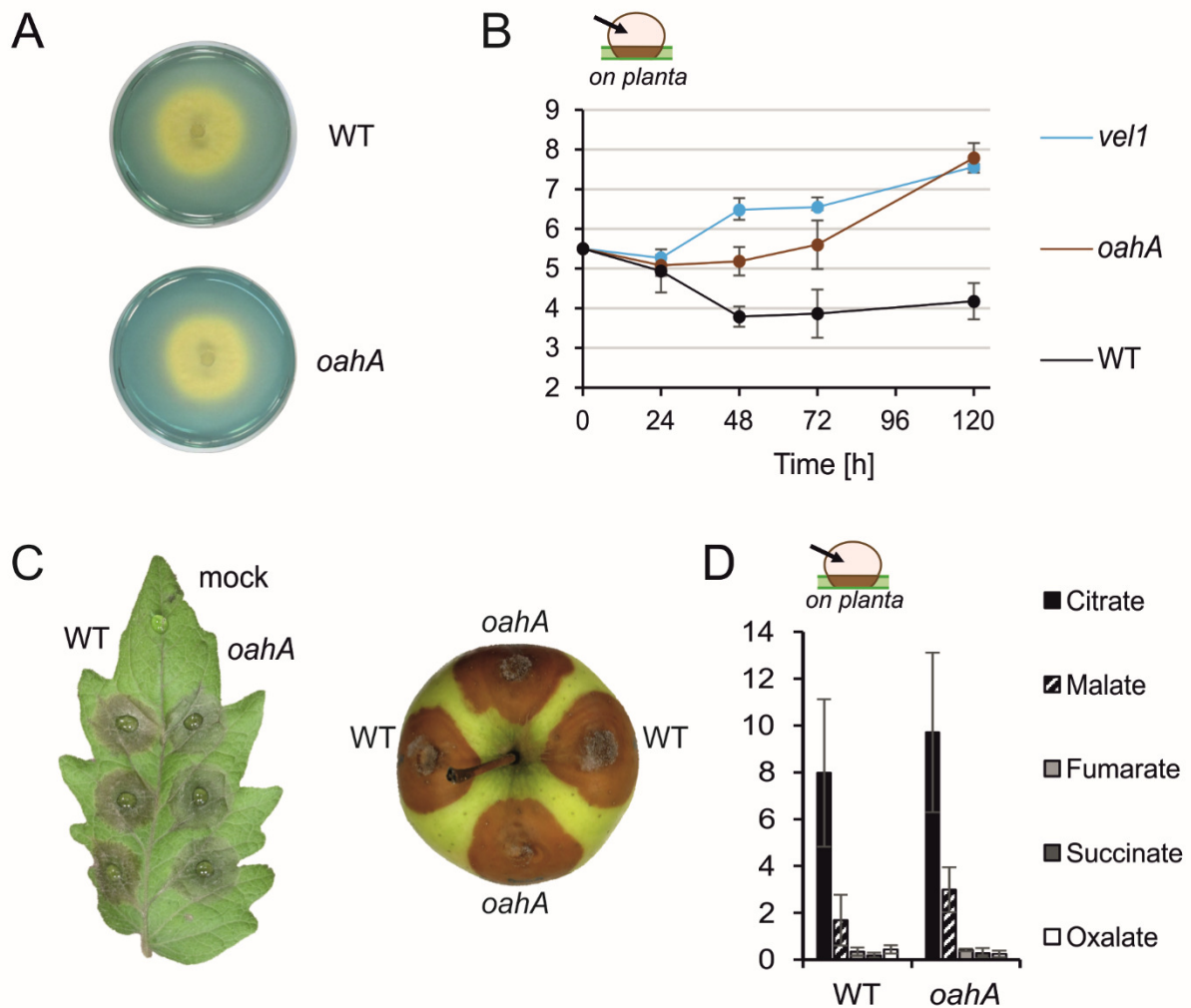
(A, B) Zeitabhängige Sekretion des Wildtyps (WT) auf künstlicher Oberfläche (A) und während der Infektion (B). (C, D) Abhängigkeit der Sekretion vom initialen pH-Wert 48 h auf künstlicher Oberfläche (C), bzw. auf Tomatenblättern (D). (E, F) Vergleich der Sekretion organischer Säuren 48 h zwischen WT und Mutanten *in vitro* (E) und *on planta* (F).

### 4.3.5.1 Die Rolle von *oahA* und Oxalat während der Infektion

Die Oxalacetat-Acetylhydrolase ist für die Synthese von Oxalat in *B. cinerea* verantwortlich. Die Expression des dafür codierenden Gens *oahA* ist in VELVET-Mutanten *in vitro* und *in planta* stark reduziert und wurde für deren fehlende Ansäuerung verantwortlich gemacht (Schumacher *et al.*, 2012; 2015). Um zu klären welchen Einfluss *oahA* und Oxalat auf Ansäuerungs- und Infektionsverhalten in *B. cinerea* haben, wurden phänotypische Analysen mit einer bereits beschriebenen *oahA* Mutante (Han *et al.*, 2007) durchgeführt. Grundsätzlich konnte die Bildung von Oxalat ausschließlich beim Wildtyp und nur nach längeren Inokulationszeiten *in vitro* bei hohem Ausgangs-pH nachgewiesen werden, nicht jedoch bei den Mutanten *oahA*, *lae1*, *vel1\** oder *vel1* (Abb. Anhang 6). Die *oahA* Mutante bildete

## Ergebnisse

normale Konidien und Sklerotien, zeigte keinerlei Veränderungen in Myzelwachstum oder -differenzierung und verhielt sich auch unter verschiedenen Stressbedingungen wie der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Die Ansäuerung von pH-Indikatorplatten blieb ebenfalls unverändert (Abb. 22A). Analysen in Flüssigmedien zeigten jedoch, dass sowohl *in vitro*, als auch *on planta* bis 72 h nach der Inokulation pH-Werte durch *oahA* eingestellt wurden, die zwischen der Ansäuerung durch den Wildtyp und der Alkalisierung durch VELVET-Mutanten lagen (Abb. 22B; Abb. Anhang 6B). Der Infektionsverlauf während dieser Phase, sowie die Sekretion organischer Säuren *in vitro* und *in planta* 48 h blieben gegenüber dem Wildtyp unverändert (Abb. 22C,D; Abb. Anhang 6C). Auch auf anderen Pflanzengeweben wie *Phaseolus*-Blättern, Gerberablütenblättern oder Äpfeln konnte bis 72 h keine reduzierte Virulenz dokumentiert werden (Abb. 22C, Daten nicht gezeigt). Nach längeren Inkubationszeiten ließ sich beobachten, dass die pH-Werte *on planta* anstiegen und nach fünf Tagen ähnliche Level wie bei der *vel1*-Mutante erreichten (Abb. 22B). Die Läsionsbildung auf Tomate verlangsamte sich nach drei Tagen und die Konidienbildung war deutlich verzögert. Auf Blättern an intakten *Phaseolus*-Pflanzen stoppte die Läsionsausbreitung nach ca. drei Tagen, während der Wildtyp sich weiter ausbreitete und bereits nach fünf Tagen das Blatt voll sporuliert war (Abb. Anhang 6D). Daraus kann geschlossen werden, dass Oxalat keine wichtige Rolle in der frühen pathogenen Entwicklung von *B. cinerea* spielt, *oahA* hat jedoch einen Einfluss auf die pH-Modulation und die Läsionsentwicklung in späteren Stadien der Infektion.

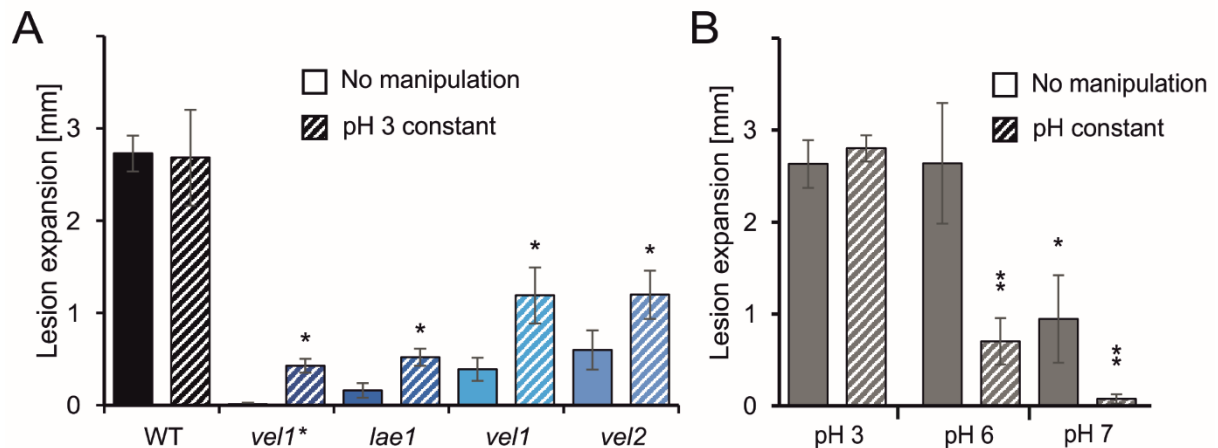


**Abb. 22: Phänotypische Charakterisierung der *oahA* Mutante.**

(A) Ansäuerung von Minimalmedium-Agarplatten visualisiert durch den pH-Indikator Bromthymolblau (72 h). (B) pH-Verlauf in Inokulationstropfen *on planta* während der Infektion von Tomatenblättern. (C) Läsionsbildung auf Tomatenblatt (72 h) und verwundetem Apfel (9 Tage). (D) Sekretion organischer Säuren auf Tomatenblättern 48 h.

#### 4.3.6 Einfluss der externen Ansäuerung und der Nährstoffverfügbarkeit

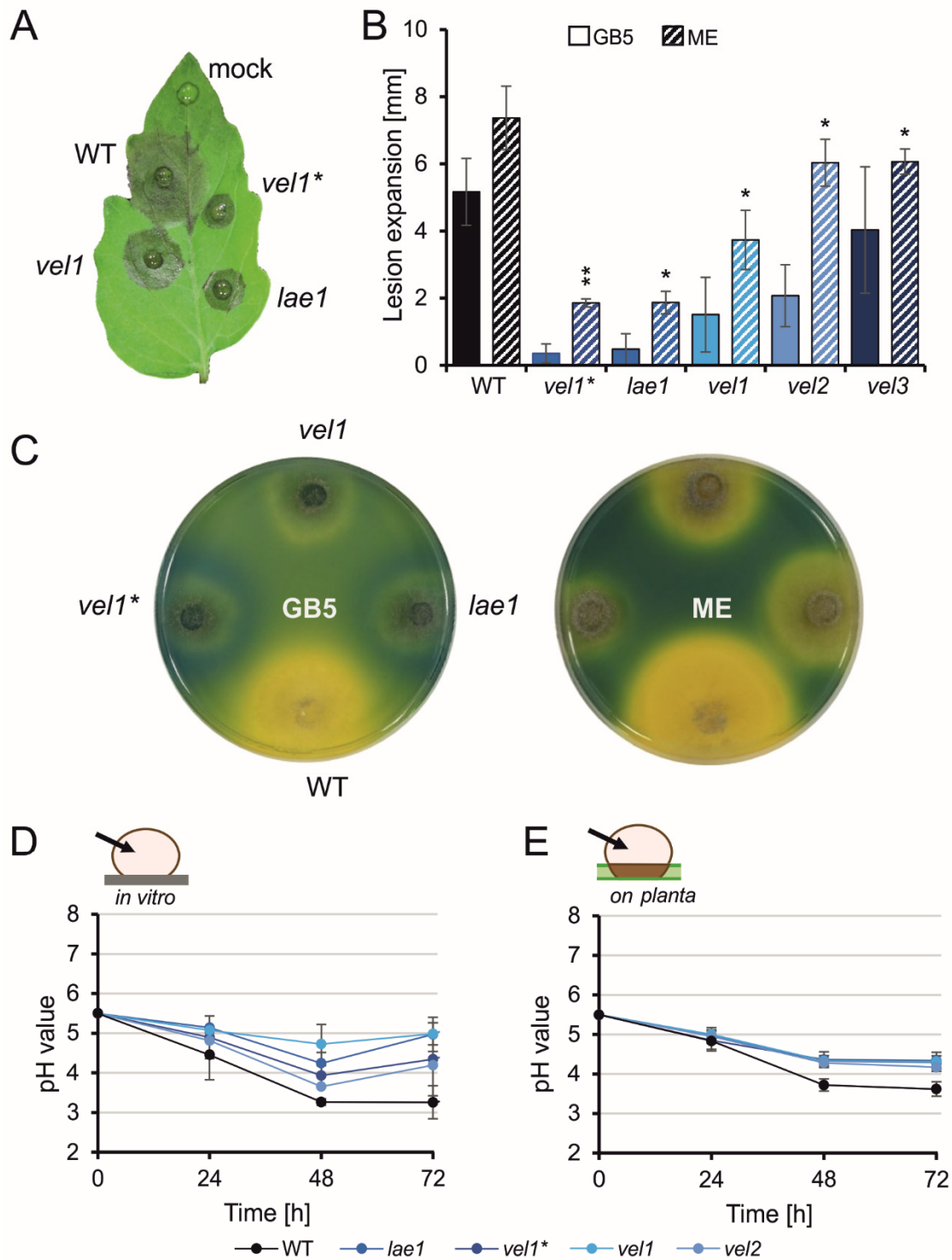
Gleichzeitige Defekte in der Ansäuerung und der Virulenz bei VELVET-Mutanten ließen vermuten, dass niedrige pH-Werte die Infektion durch *B. cinerea* positiv beeinflussen. Um das zu bestätigen, wurden pH-Manipulationsexperimente durchgeführt, bei denen durch regelmäßiges Austauschen der Inokulationstropfen der pH-Wert im Infektionstest konstant gehalten wurde. Es konnte beobachtet werden, dass ein konstant niedriger pH-Wert (pH 3) signifikant die Läsionsausbreitung der VELVET-Mutanten förderte, während beim Wildtyp keine Verbesserung zu beobachten war (Abb. 23A). Zusätzlich konnte für den Wildtyp gezeigt werden, dass ein konstant hoher pH-Wert die Expansion im Gewebe signifikant reduzierte (pH 6) oder sogar verhinderte (pH 7) (Abb. 23B).



**Abb. 23: Effekte der pH-Manipulation auf die Läsionsausbreitung in Tomatenblättern (48 h).**

Die Inokulationstropfen auf den Blättern blieben entweder unberührt (no manipulation) oder wurden in regelmäßigen Abständen durch Minimalmediumstropfen (ohne Zucker) ersetzt um den jeweils angegebenen pH-Wert konstant zu halten. **(A)** Läsionsausbreitung durch *B. cinerea* Wildtyp (WT) und Mutanten nach Inokulation bei niedrigem Ausgangs-pH (pH 3). **(B)** Läsionsausbreitung durch den WT bei unterschiedlichen Ausgangs-pH-Werten. Signifikante Unterschiede zwischen pH-Manipulation und natürlichem Infektionsverlauf sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*).

Die Steigerung der Virulenz durch pH-Manipulation war mit zusätzlichem Zucker in den Austauschtropfen stärker ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Da somit Nährstoffe einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Läsionsentwicklung hatten, wurden im Folgenden Experimente mit nährstoffreichem Malzextrakt-Vollmedium (ME) durchgeführt. Während Standard-Infektionstests in der Arbeitsgruppe in Gamborg-Minimalmedium mit 25 mM Glucose (GB5) angesetzt werden, führte die Inokulation mit ME bei allen VELVET-Mutanten zu einer signifikant gesteigerten Läsionsausbreitung. Mit ME-Inokulation waren *vel1\** und *lae1* in der Lage deutliche Sekundärläsionen zu bilden (Abb. 24A,B). pH-Indikatorplatten, welche ME enthielten, zeigten im Gegensatz zu Testplatten mit GB5 keinen Azidifizierungsdefekt der VELVET-Mutanten (Abb. 24C). Auch die Inokulation von Sporen in ME *in vitro* auf Polypropylenfolie führte zu einer deutlichen Azidifizierung durch die Mutanten (Abb. 24D). Die Messung der Inokulationstropfen *on planta* zeigte eine Wildtyp-ähnliche Ansäuerung in den expandierenden Läsionen der Mutanten (Abb. 24E).



**Abb. 24: Einfluss von Vollmedium auf Infektion und Ansäuerung bei *B. cinerea* Wildtyp (WT) und Mutanten.**

(A) pH-Modulation durch *B. cinerea* Stämme im Vergleich zwischen Minimalmedium (GB5) und Vollmedium (ME) auf Agarplatten 72 h (pH 7,5, Indikator Bromthymolblau). (B, C) pH-Verlauf in Vollmediums-Inokulationstropfen ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) *in vitro* auf künstlicher Oberfläche (B) und *on planta* während der Infektion von Tomatenblättern (C). (D) Sekundärläsionsbildung durch WT und VELVET-Mutanten nach Inokulation von Sporen in ME auf Tomatenblättern 72 h. (E) Radiale Ausbreitung der Läsionen 72 h auf Tomatenblättern, WT und Mutanten im Vergleich zwischen Inokulation der Sporen in GB5 und Vollmedium ME. Signifikante Abweichungen in (B) im Vergleich zu Minimalmedium sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*).



## Ergebnisse

Aufgrund der gesteigerten Infektionsfähigkeit und Ansäuerung durch Vollmedium wurde die Expression Virulenz-assoziiierter Gene überprüft. Während *acp1* und *ap8*, welche für im *B. cinerea* Sekretom abundante Proteasen codieren, pH-reguliert sind, ist *pg1*, das Gen für die Endopolygalacturonase 1 pH-unabhängig exprimiert. Alle drei Gene sind in den VELVET-Mutanten unter Standardbedingungen stark herunterreguliert (vgl. 4.3.7), zeigten aber während der Infektion mit Vollmedium gesteigerte Transkript-Level, während die Expression im Wildtyp gegenüber GB5-Inokulation unverändert stark blieb (Abb. Angang 7A). Zusätzlich zur Genexpression wurde die Protease-Aktivität von *on planta* Exudaten vor allem bei *vel1* und *vel2* Mutanten erhöht. Hier zeigte auch der Wildtyp eine deutliche Steigerung im Vergleich zu Minimalmedium (Abb. Angang 7B).

Die Ansäuerung des umgebenden Mediums wurde kürzlich bei verschiedenen Pilzen mit der Zuckerkonzentration im Inokulationsmedium korreliert, wobei die Entstehung von Gluconat für die externe Azidifizierung verantwortlich gemacht wurde (Bi *et al.*, 2016). Bei *B. cinerea* konnte eine Erhöhung der Konzentration auf 50 bis zu 175 mM Glucose im GB5-Medium weder die Infektion steigern, noch die Azidifizierung während der ersten drei Tage *in planta* oder *in vitro* beeinflussen (Daten nicht gezeigt, Abb. Angang 8A,B). Die Ansäuerung *in vitro*, sowie die Ansäuerung und Läsionsbildung während der Infektion zeigten außerdem keinerlei Unterschiede im Vergleich zwischen Glucose und Fructose (Abb. Angang 8C). Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Bildung von Gluconat, die durch Oxidation von Glucose durch eine apoplastische Glucose-Oxidase erfolgt, eine Rolle in der *B. cinerea* Azidifizierung oder der Infektion spielt.

### 4.3.7 Vergleichende *in planta* Transkriptom-Analysen von VELVET-Mutanten

Um die molekularen Ursachen der reduzierten Virulenz der VELVET-Mutanten besser zu verstehen wurden Transkriptom-Analysen durchgeführt. Dazu wurde RNA aus mit dem Wildtyp, sowie mit *vel1\**, *lae1* und *vel1* infizierten Tomatenblättern im Primärläsionsstadium (24 h) isoliert und sequenziert. Zum Vergleich wurde zusätzlich Wildtyp RNA aus *in vitro* Wachstum (32 h) isoliert. Eine unveröffentlichte Vorversion der neuesten *B. cinerea* B05.10 Genomsequenz wurde als Referenz für RNAseq Alignments verwendet (vgl. 6.9.3). Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine umfangreiche Auswertungs-Datei erstellt (RNAseq-Tabelle), die neben Informationen zu Expressionsänderungen in den verschiedenen Mutanten und dem Wildtyp auch beispielsweise eine Einteilung der Gene/Proteine in funktionelle Klassen enthält. Der genaue Inhalt ist im Anhang näher erläutert (vgl. 8.3.1).

Insgesamt zeigten ca. 7.700 der 11.990 annotierten Gene im *B. cinerea* Wildtyp eine deutliche Expression der entsprechenden mRNAs (RPKM>5). Im Vergleich zum Wildtyp wurden in den Mutanten *vel1\**, *lae1* und *vel1* jeweils mehr als 1600 der exprimierten Gene mehr als zweifach differenziell exprimiert (Abb. 25A). Damit wurden deutlich mehr VELVET-regulierte Gene identifiziert als in einer vorangehenden Microarray-Analyse der *vel1*

## Ergebnisse

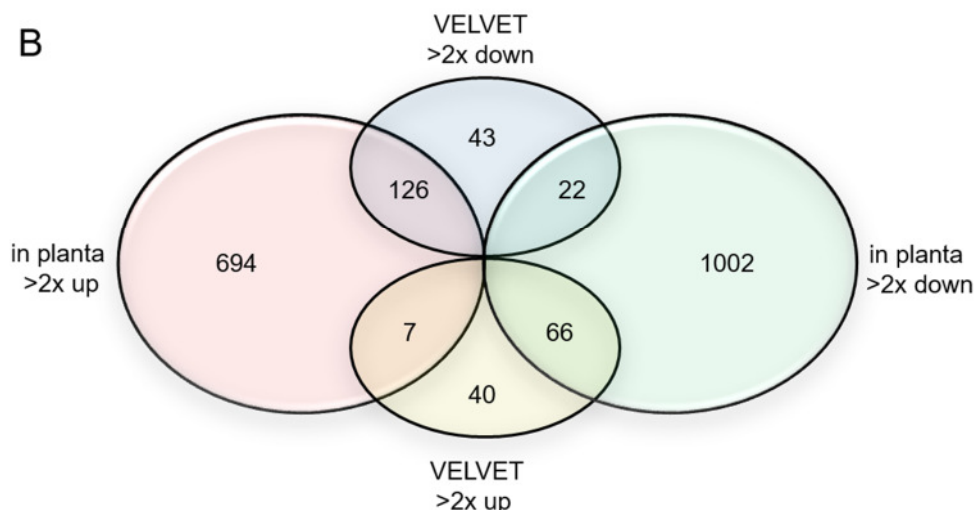
Mutante auf *Phaseolus*-Blättern (227 schwächer und 419 stärker exprimierte Gene in Schumacher *et al.*, 2012). Der Vergleich der regulierten Gene zwischen den Proben zeigte eine deutlich größere Übereinstimmung zwischen *lae1* und *vel1* als zwischen *vel1\** und den anderen beiden Mutanten (Abb. Anhang 9).

Da angenommen wird, dass die in verschiedenen VELVET-Mutanten koregulierten Gene mitverantwortlich für deren gemeinsame Phänotypen sind, wurde die Schnittmenge aller drei Mutanten näher betrachtet. Das koregulierte Datenset war mit 191 im Vergleich zum Wildtyp mehr als zweifach schwächer und 113 mehr als zweifach stärker exprimierten Genen gegenüber den Einzelvergleichen deutlich reduziert (Abb. 25A, Abb. Anhang 9). Mehr als 65% (126) der VELVET-herunterregulierten Gene waren im Vergleich Wildtyp *in planta* mit *in vitro* Bedingung im Wildtyp erhöht, also *in planta* induziert. Auf der anderen Seite waren mehr als 58% (66) der VELVET-hochregulierten Gene *in vitro* im Wildtyp stärker exprimiert (Abb. 25B). Insgesamt sind mehr als 15% aller *in planta* im Wildtyp induzierten Gene (827) in allen VELVET-Mutanten schwächer exprimiert. Diese starke Korrelation weist darauf hin, dass der VELVET-Komplex eine zentrale Bedeutung für die transkriptionelle Regulation von Genen hat, welche für die Infektion wichtig sind.

A

		Mutants vs. WT ( <i>in planta</i> 24 h)				WT
		<i>vel1*</i>	<i>lae1</i>	<i>vel1</i>	All 3 VELVET	<i>in planta</i> 24 h vs. <i>in vitro</i> 32 h
>2x	down	619	1222	868	191	1090
	up	1007	1222	833	113	827

B

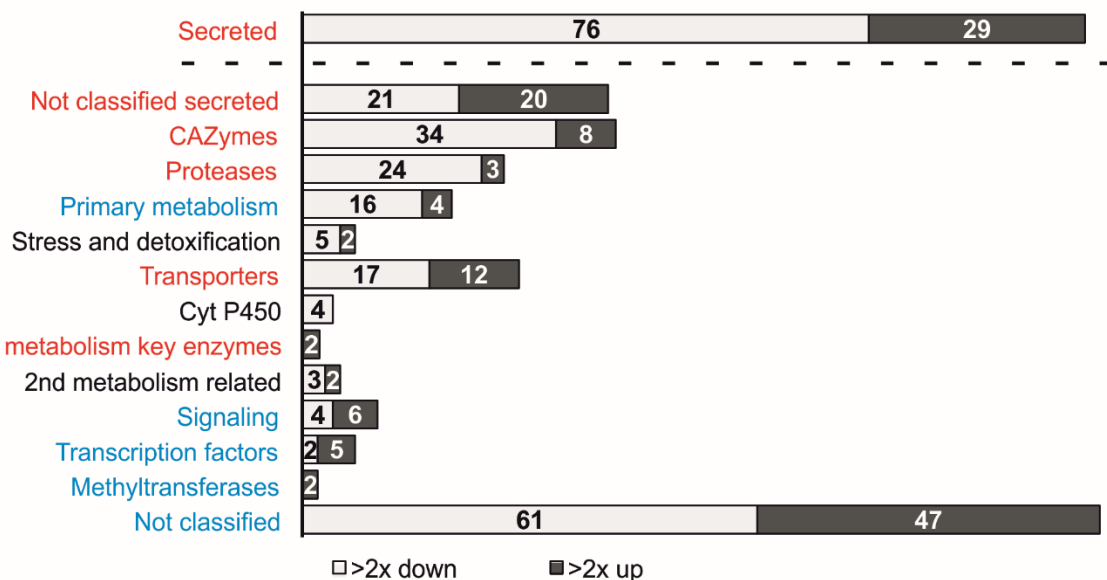


**Abb. 25: RNAseq basierte differenzielle Expression in *B. cinerea* VELVET-Mutanten.**

(A) Anzahl differenziell exprimierter Gene in *vel1\**, *lae1* und *vel1* gegenüber dem Wildtyp (24 h *in planta*). (B) VELVET-regulierte Gene korrelieren mit der *in planta* Regulation im Wildtyp: Gene, die im Vergleich *in planta* mit *in vitro* (32 h) des Wildtyps in der Pflanze stärker exprimiert werden, sind in VELVET-Mutanten herunterreguliert. Gene, die beim Wildtyp *in vitro* stärker exprimiert sind, sind in den Mutanten eher überrepräsentiert.

## Ergebnisse

Die funktionelle Klassifizierung der 304 VELVET-koregulierten Gene zeigte, dass Gene bestimmter funktioneller Klassen in ihrer Anzahl regulierter Gene über- oder unterrepräsentiert waren (Tab. Anhang 2). Bemerkenswert war beispielsweise, dass 34,5% (105) der regulierten Gene für sekretierte Proteine codieren (Abb. 26). Die Kategorie der sekretierten Proteine war damit mehr als deutlich angereichert (Abb. 26; Tab. Anhang 2). Die größte Gruppe regulierter Gene stellten in den Mutanten vornehmlich herunterregulierte Gene für CAZymes dar, gefolgt von ebenfalls vorwiegend herunterregulierten Genen für Proteasen. Zusätzlich zu diesen beiden Klassen zeigte sich eine Anreicherung von Genen für Transporter. Eine Interpretation dieser Änderungen ist allerdings schwierig, da unterschiedliche Transportergruppen gleichermaßen über- als auch unterexprimiert waren. Obwohl in den Mutanten im Einzelvergleich einige Zuckertransporter über- oder unterrepräsentiert waren, konnte die in Schumacher *et al.*, 2012 in der *vel1*-Mutante thematisierte Überexpression von zwölf Genen für Zuckertransporter nicht bestätigt werden. Die Gruppe der Transkriptionsfaktoren war in der differentiellen Koregulation deutlich unterrepräsentiert, in den Einzelvergleichen waren jedoch deutlich mehr Transkriptionsfaktor-Gene über- oder unterexprimiert (RNAseq-Tabelle).



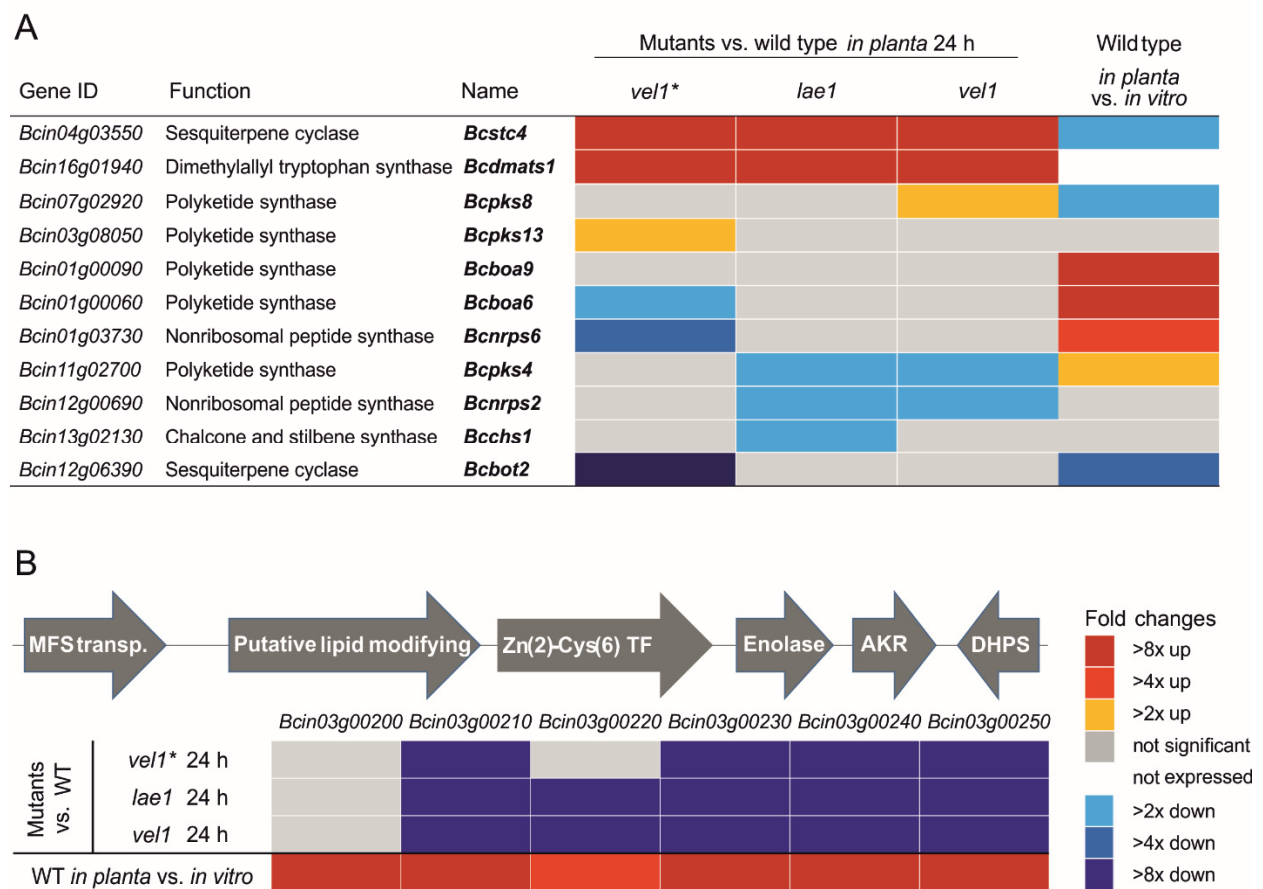
**Abb. 26: Funktionelle Klassifizierung der 304 in VELVET-Mutanten koregulierten Gene.**

Dargestellt ist jeweils die Anzahl der in den Klassen exprimierten (RPKM>5), koregulierten Gene im RNAseq-Vergleich zwischen Mutanten und dem Wildtyp 24 h *in planta*. Die im Z-Test signifikante ( $p < 0,01$ ) Anreicherung (rot) oder Unterrepräsentation (blau) einer Klasse im Vergleich zu allen exprimierten Genen derselben ist farbig markiert (vgl. Tab. Anhang 2). Gene, die für sekretierte Proteine codieren, sind als separate Kategorie aufgeführt, die Schnittmengen mit anderen Klassen aufweist.

Auch Gene, die für Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus codieren, waren in der Expressionsänderung angereichert, obwohl nur zwei eine signifikante Änderung zeigten (Abb. Anhang 2, Abb. 27A). In dieser Studie konnte lediglich für 13 der 44 im *B. cinerea*

## Ergebnisse

vorkommenden Schlüsselgene eine Expression über dem festgesetzten Wert von RPKM>5 gezeigt werden. Gene des Botcinin-Clusters waren im Wildtyp *in planta* induziert, jedoch in den Mutanten nicht differenziell exprimiert. Ausschließlich in *vel1\** waren Gene des Botrydial-Clusters *in planta* herunterreguliert und zeigten generell im Wildtyp *in vitro* eine stärkere Expression als *in planta*. Eine Bedeutung der beiden Toxine für den VELVET-Phänotyp kann damit ausgeschlossen werden. Ein neu entdecktes putatives Sekundärmetabolismus-Gencluster aus sechs Genen, welches in allen VELVET-Mutanten signifikant schwächer exprimiert war, zeigte zusätzlich eine massive *in planta* Induktion im Wildtyp. Es enthält einen MFS-Transporter, einen Transkriptionsfaktor und ein Protein mit Domänen zur Acyl-Aktivierung, Thioester-Reduktion und CoA-Bindung, welches für Modifizierung von Fetten zuständig sein könnte (Abb. 27B).



**Abb. 27: Differenzielle Expression von Sekundärmetabolismus-Genclustern in *B. cinerea* *in planta* und in VELVET-Mutanten.**

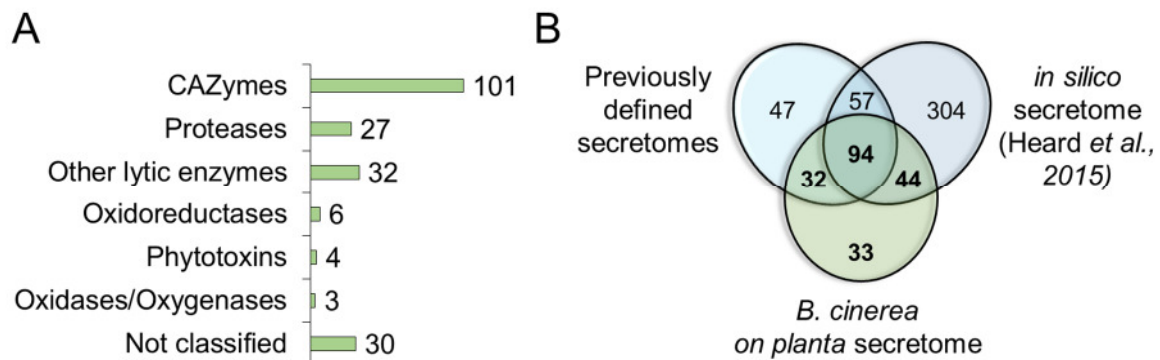
RNAseq basierte Expressionsunterschiede (fold changes) zwischen *B. cinerea* Wildtyp und VELVET-Mutanten (24 h *in planta*). **(A)** Differenziell in VELVET-Mutanten exprimierte Gene für Sekundärmetabolismus-Schlüsselenzyme (24 h *in planta*). **(B)** Herunterregulierung eines putativen *in planta* induzierten Sekundärmetabolismus-Genclusters TF: Transkriptionsfaktor, AKR: Aldo-/Keto-Reduktase, DHPS: Dihydropicolinat-Synthase ähnlich. Nicht signifikante Werte (grau) entweder unterhalb des Schwellenwerts einer zweifachen Änderung, oder FDR-korrigierter p-value größer als 0,05. Gene mit einem RPKM-Wert <5 wurden als nicht exprimiert definiert (weiß). Die Spalte rechts in (A) bzw. die untere Linie in (B) vergleicht zusätzlich die Expression im Wildtyp (WT) *in vitro* mit *in planta* (24 h) Bedingungen.

### 4.3.8 Quantitative Sekretomanalysen korrelieren stark mit dem mRNA-Level

#### 4.3.8.1 Das *B. cinerea on planta* Sekretom

In einem neu entwickelten Versuchsansatz wurden während der Infektion von Tomatenblättern die Inokulationstropfen nach 48 h als *on planta* Exudate abgenommen, die Proteine aufgereinigt und von Frederik Sommer (AG Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU KL) mittels Massenspektrometrie (MS/MS) untersucht. Es wurden zum einen Experimente zur qualitativen Analyse des *B. cinerea* Sekretoms durchgeführt (vgl. 4.4.4), wobei die gemessenen MS/MS „peptide ion intensities“ als Anhaltspunkte für die relative Menge der identifizierten Proteine betrachtet werden können. Zum anderen wurde eine quantitative Sekretomanalyse mittels <sup>15</sup>N-metabolischer Markierung (Becker *et al.*, 2008; Mühlhaus *et al.*, 2011) durchgeführt um die Sekretome der VELVET-Mutanten und des Wildtyps zu vergleichen. Eine Gesamtliste der in einem der beiden Versuchsansätze mindestens in zwei Replikaten vorkommenden *in silico* als sekretiert vorhergesagten *B. cinerea* Wildtyp Proteine ist im Anhang beschrieben (Sekretomtabelle A). Die Einteilung der sekretierten *B. cinerea* Proteine in funktionelle Gruppen verdeutlicht die Dominanz der CAZymes, Proteasen und anderen lytischen Enzyme im Sekretom (Abb. 28A). Eine Abundanz von CAZymes (ca. 30%) und Proteasen (ca. 8%) wurde kürzlich in einem ähnlichen Versuchsansatz im *in planta* Sekretom nach 28 h gezeigt (Zhu *et al.*, 2017). In dieser Studie, zu späteren Infektionszeitpunkten (48 h), stellen CAZymes während der Infektion sogar die Hälfte aller im *B. cinerea* Sekretom vorkommenden Proteine dar, während Proteasen mehr als 13% der sekretierten Proteine ausmachten (Abb. 28A). Im Vergleich zu früheren Analysen konnten im *on planta* Sekretom zusätzliche Proteine identifiziert werden, einige der bisher gefundenen Proteine tauchten jedoch nicht auf. Der Grund für das Fehlen könnte der spätere Zeitpunkt der Analyse sein, wahrscheinlich ist jedoch auch, dass *on planta* einige der *in vitro* induzierten Proteine nicht exprimiert werden. Mehr als 40 der tatsächlich sekretierten Proteine wurden in dem durch Heard *et al.* (2015) definierten *in silico* Sekretom nicht vorhergesagt (vgl. Abb. 28B).

Insgesamt bedeutet dies, dass sich das in dieser Arbeit untersuchte *on planta* Sekretom des *B. cinerea* Wildtyps nach 48 h von *in vitro* Bedingungen und vom *in planta* Sekretom während früherer Infektionsstadien unterscheidet. Besonders die Abundanz der CAZymes und Proteasen nimmt im Infektionsverlauf deutlich zu. Die hauptsächliche Proteaseaktivität im *B. cinerea* Sekretom auf Tomate konnte durch Pepstatin A (Aspartylproteasen-Inhibitor) gehemmt werden, auch PMSF (Serinproteasen-Inhibitor) hatte einen geringen Einfluss (Abb Anhang 12).



**Abb. 28: Das *B. cinerea on planta* Sekretom.**

(A) Funktionelle Klassifizierung der 203 *on planta* (48 h) sekretierten *B. cinerea* Proteine. (B) Vergleich des 48 h *on planta* Sekretoms mit dem *in silico* Sekretom (Heard *et al.*, 2015) und mit anderen *B. cinerea* Sekretomanalysen (Shah *et al.*, 2009a; Shah *et al.*, 2009b; Espino *et al.*, 2010; Fernández-Acero *et al.*, 2010; González *et al.*, 2014).

#### 4.3.8.2 <sup>15</sup>N-Quantifizierung differenziell sekretierter Proteine

Um die Sekretome der VELVET-Mutanten *vel1\** und *lae1* mit dem des *B. cinerea* Wildtyps quantitativ vergleichen zu können, wurden *on planta* (48 h) Sekretom-Proben jeweils mit einer zu 98% <sup>15</sup>N-markierten Wildtyp-Probe (Mischung aus <sup>15</sup>N-Wildtyp-Sekretomen von <sup>15</sup>N-Tomatenpflanzen und Flüssigkultur) versetzt und die Proteine nach der Mischung gemeinsam aufgereinigt. Die MS/MS-Analyse der <sup>15</sup>N-markierten Proben und deren Auswertung wurden von Frederik Sommer, Timo Mühlhaus und David Zimmer (AG Molekulare Biotechnologie und Systembiologie, TU KL) durchgeführt und die Verhältnisse der <sup>14</sup>N- und <sup>15</sup>N-Proteine in der Probe ermittelt. Daraufhin konnte eine Liste der x-fachen differentiellen Sekretion der Proteine der beiden VELVET-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erstellt werden. Im *on planta* (48 h) Sekretom aller analysierten Stämme wurden insgesamt 164 sekretierte und 10 nicht-sekretierte *Botrytis*-Proteine, sowie 49 sekretierte und 92 nicht sekretierte Tomatenproteine identifiziert, welche signifikant vertreten (in mindestens zwei Replikaten) und quantitativ auswertbar waren. Im Wildtyp-Sekretom konnten insgesamt deutlich mehr *B. cinerea*-Proteine identifiziert werden. Die über die MS/MS-Intensitäten ermittelten Anteile der sekretierten *B. cinerea*-Proteine waren beim Wildtyp mit fast 89% im Vergleich zu weniger als 50% bei den VELVET-Mutanten fast zweifach höher (Tab. 4). Die Gesamtmenge an isolierten Protein war jedoch über die verschiedenen Sekretom-Proben verteilt einheitlich (Daten nicht gezeigt). Die reduzierte Zahl und Menge an sekretierten Pilz-Proteinen wurde ausgeglichen durch eine höhere absolute Anzahl und erhöhte Anteile von mehr als 40% nicht-sekretierter Tomatenproteine in den Sekretomen der VELVET-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 4). Dies ist ein Indiz dafür, dass die VELVET-Mutanten nicht wie der Wildtyp in der Lage sind Pflanzenproteine aus dem nekrotischen Gewebe effizient abzubauen.

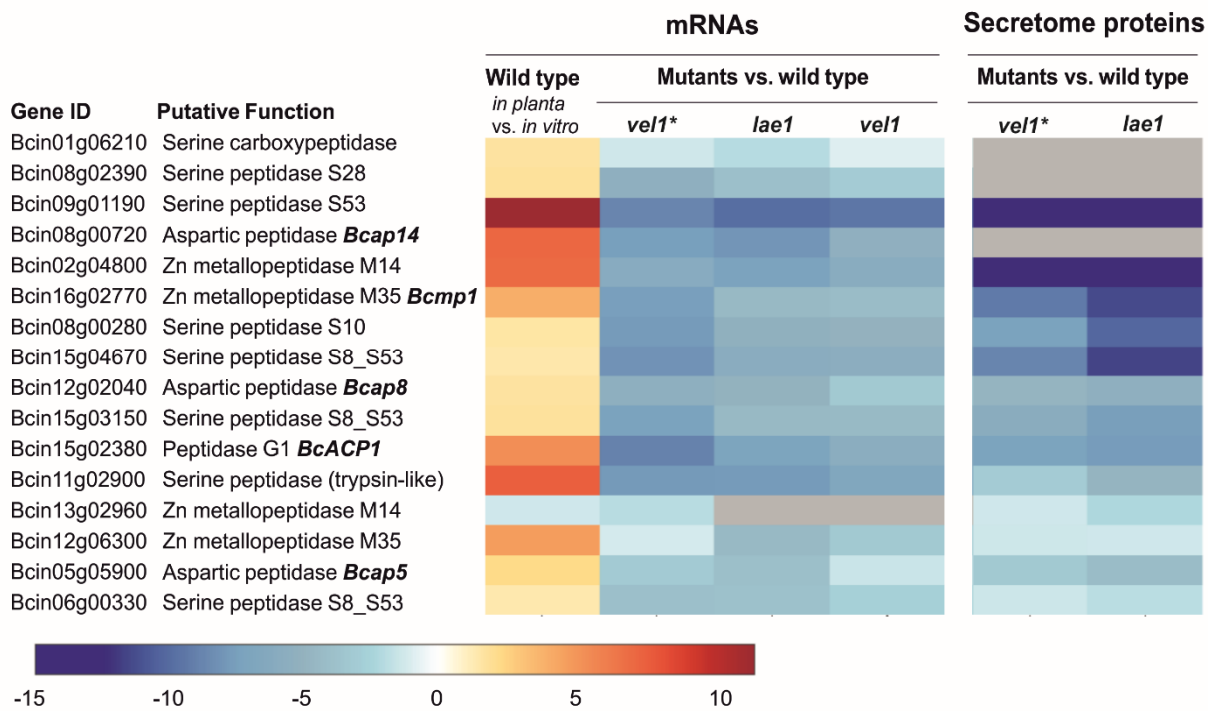
**Tab. 4: Verteilung pilzlicher und pflanzlicher Proteine während der Infektion mit *B. cinerea* Wildtyp und Mutanten *on planta* (48 h).**

	<i>B. cinerea</i> proteins				Tomato proteins			
	secreted		non-secreted		secreted		non-secreted	
	Number	Relative amount	Number	Relative amount	Number	Relative amount	Number	Relative amount
<b>WT</b>	160	88.9 %	3	0.5 %	40	7.4 %	24	3.2 %
<b><i>lae1</i></b>	118	36.9 %	6	4.2 %	28	16.7 %	73	42.2 %
<b><i>vel1*</i></b>	130	49.2 %	8	3.5 %	34	6.8 %	63	40.5 %

Im quantitativen Vergleich der sekretierten *B. cinerea*-Proteine wurden aufgrund der unterschiedlichen Anteile an der Gesamtprobe ausschließlich Proteine als signifikant reduziert erachtet, die mehr als vierfach schwächer durch Mutanten sekretiert waren oder bei diesen fehlten. Insgesamt waren 72 Proteine im Sekretom beider Mutanten unterrepräsentiert. Die beiden größten unterexprimierten funktionellen Klassen waren CAZymes (30) und Proteasen (14), gefolgt von anderen lytischen Enzymen (10). Nur elf sekretierte Proteine waren in den VELVET-Sekretomen abundanter vorhanden, darunter 7 CAZymes und 3 lytische Enzyme (Abb. Anhang 10). In Kooperation mit der AG Molekulare Biotechnologie und Systembiologie wurden die RNAseq-Daten mit der neueren und statistisch gefestigteren DESeq2-Analyse erneut analysiert (vgl. Material & Methoden). Insgesamt wurden die gezeigten Ergebnisse der Transkriptomanalyse reproduziert. Die Datensätze von *vel1\**, *lae1* und *vel1* wurden in der DESeq2-Analyse nicht nur einzeln, sondern auch als biologische Replikate einer einzigen „Gruppe der VELVET-Mutanten“ analysiert, um statistisch signifikante koregulierte Gene zu identifizieren. Daraus ergab sich eine noch eindrucksvollere Gesamtanzahl von in den VELVET-Mutanten differenziell exprimierten Genen, die Verteilung der funktionellen Gruppen blieb jedoch ähnlich (Daten nicht gezeigt). Die differenzielle Expression in den Mutanten *lae1* und *vel1\** in den neuen Datensätzen (mRNA Level 24 h *in planta*) wurde mit der Abundanz der Proteine in den Sekretomen (48 h *on planta*) des Wildtyps und der VELVET-Mutanten *lae1* und *vel1\** verglichen. Es konnte eine eindeutige Korrelation der beiden Analysen festgestellt werden (Abb. Anhang 11). Die Gegenüberstellung aller koregulierten sekretierten Proteasen verdeutlicht dieses Bild. 13 der 15 auf mRNA-Level regulierten Proteasen sind auch im Sekretom der Mutanten stark unterrepräsentiert (Abb. 29). Die ausschließliche Herunterregulierung dieser Proteasen erklärt die deutlich geringere Proteaseaktivität der VELVET-Mutanten (Abb. Anhang 7). Auch die in RNAseq koregulierten CAZymes zeigten eine bemerkenswerte Übereinstimmung in der Protein-Abundanz (Abb. Anhang 13). Sowohl herunterregulierte Proteasen, als auch CAZymes zeigten außerdem eine eindeutige Korrelation mit der *in planta* Induktion in RNAseq Analysen des Wildtyps, was ein weiteres

## Ergebnisse

Indiz für die wichtige Rolle dieser regulierten Proteine für die Virulenz von *B. cinerea* ist (Abb. 29, Abb. Anhang13).



**Abb. 29: In VELVET-Mutanten koregulierte sekretierte Proteasen.**

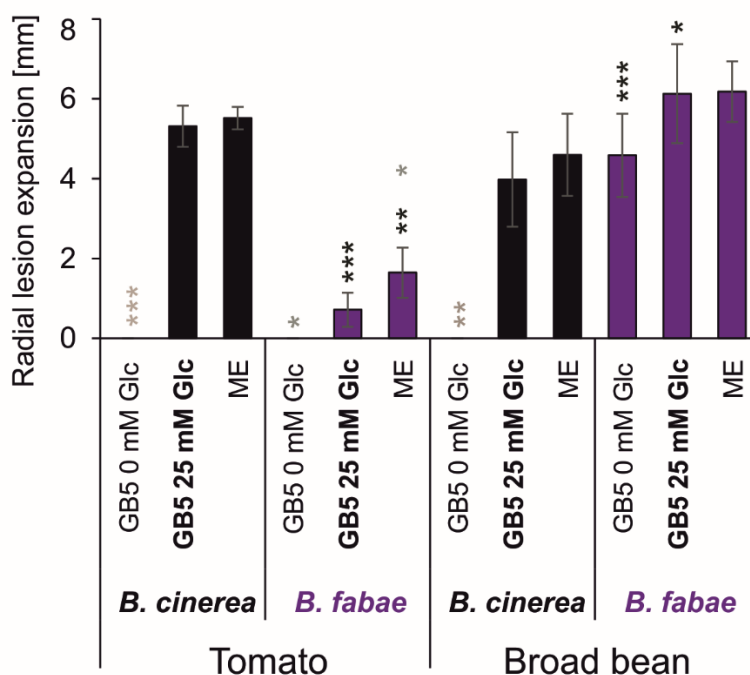
Farbig dargestellt ist die differenzielle Expression aller sekretierten *B. cinerea* Proteasen in x-facher Expressionsänderung, welche eine Koregulation in VELVET-Mutanten entweder auf mRNA-Level und/oder in der quantitativen Sekretom-Analyse zeigten. Zusätzlich ist in der Spalte links die differenzielle Expression im Wildtyp *in vitro* im Vergleich zu *in planta* (24 h) Bedingungen gezeigt. Das hierarchische Clustering und die Darstellung als Heatmap wurde durch D. Zimmer erstellt. Transkriptomdaten wurden mithilfe der DESeq2-Analyse ausgewertet.



## 4.4 Vergleiche des Infektionsverhaltens von *B. fabae* und *B. cinerea*

### 4.4.1 *B. fabae* kann Ackerbohne bei hohem pH erfolgreich infizieren

Unter Standardbedingungen sind die durch *B. fabae* verursachten Läsionen auf Ackerbohne größer als die durch *B. cinerea*. Auf der Nicht-Wirtspflanze Tomate bildet *B. fabae* jedoch ausschließlich sich kaum ausbreitende Primärläsionen. *B. cinerea* benötigt für eine erfolgreiche Infektion von intaktem Pflanzengewebe i.d.R. Nährstoffe, vor allem Zucker. In Minimalmedium ohne Zucker führte die Inokulation von Tomate und Bohne zu keiner Infektion. Dagegen war die Infektion von Ackerbohne durch *B. fabae* unabhängig von Nährstoffen. Die Zugabe von Vollmedium konnte jedoch im Widerspruch dazu die Bildung von Sekundärläsionen auf Tomate stimulieren (Abb. 30).



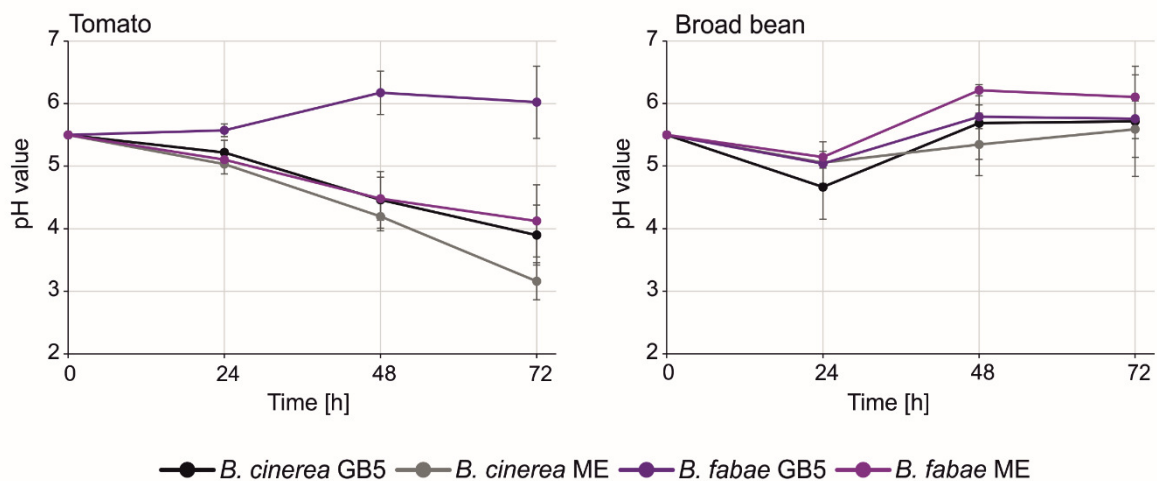
**Abb. 30: Radiale Läsionsausbreitung von *B. cinerea* und *B. fabae* nach 72 h unter unterschiedlichen Nährstoffbedingungen.**

Gezeigt sind jeweils Werte des *B. cinerea* Stamms B05.10, dreier verschiedener *B. fabae* Stämme (11002, D12\_B\_B09, G12\_?\_B02). Die Inokulation der Tomaten- oder Ackerbohnenblätter erfolgte mit Sporen entweder in Gamborg-Minimalmedium (GB5) ohne Glucose (Glc), GB5 mit 25 mM Glucose, oder mit Malzextrakt-Vollmedium (ME). Signifikante Abweichungen von *B. cinerea* unter der gleichen Bedingung sind mit schwarzen Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*;  $p < 0,001$ :\*\*\*), signifikante Abweichungen im Vergleich zur Standardinokulation (GB5 25 mM Glc) mit grauen Sternchen ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*;  $p < 0,001$ :\*\*\*).

Eine Korrelation zwischen verringerter Virulenz und fehlender Ansäuerung auf Tomatenblättern konnte bereits bei VELVET-Mutanten und durch die pH-Manipulation von *B. cinerea* auf Tomatenblättern gezeigt werden (vgl. Abb 23). Es wurde gezeigt, dass *B. fabae* auf Tomatenblättern unter Standardbedingungen nicht in der Lage ist das Gewebe anzusäuern, und keine expandierenden Läsionen bildet (Abb. 31A).

## Ergebnisse

Die Inokulation mit Vollmedium (ME) ermöglichte *B. fabae* das Tomatengewebe anzusäuern, was ein Indiz dafür ist, dass die Ansäuerung einen Einfluss auf die Sekundärläsionsbildung haben könnte. Konstant niedrige pH-Werte zeigten im pH-Manipulationsexperiment jedoch nahezu keine Förderung der Läsionsausbreitung (Könnel, 2015). Die Infektion von Tomatenblättern ist damit bei *B. fabae* zwar ebenfalls von Nährstoffen, aber nicht wie bei VELVET-Mutanten direkt vom pH-Wert abhängig. Im Gegensatz dazu entwickelte sich auf Ackerbohne bei beiden Spezies während der erfolgreichen Infektion ein pH-Wert von ca. 5,8 (Abb. 31B), welcher durch Inokulation mit Vollmedium unbeeinflusst blieb. Daraus lässt sich schließen, dass keine Ansäuerung der Ackerbohne für die Infektion notwendig ist.

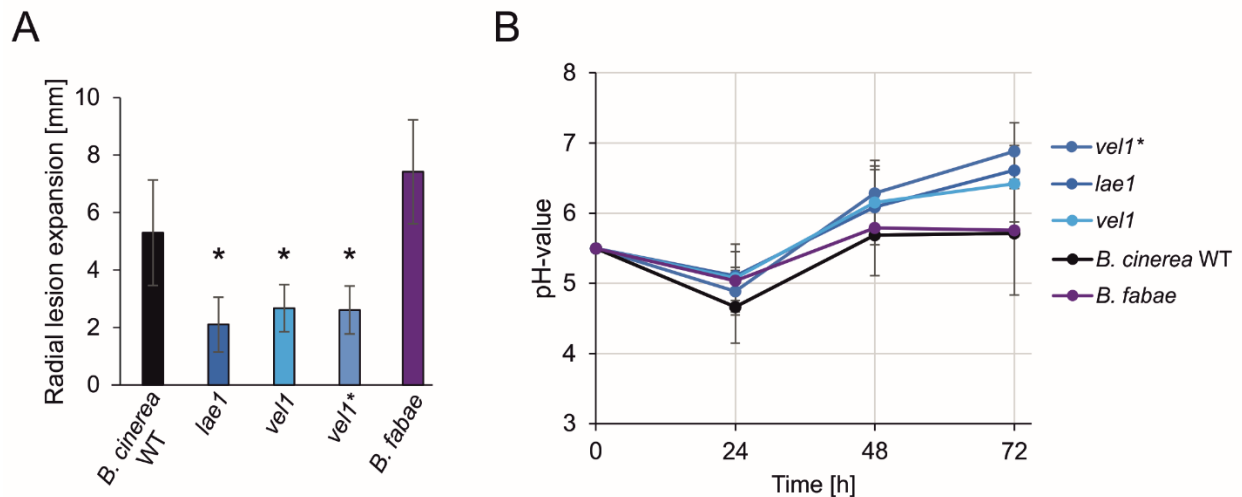


**Abb. 31: pH-Verlauf während der Infektion von Tomatenblättern bzw. Ackerbohnenblättern im Vergleich zwischen *B. cinerea* und *B. fabae*.**

*B. fabae* Mittelwerte setzen sich aus drei verschiedenen *B. fabae* Stämmen zusammen (11002, D12\_B\_B09, G12\_?\_B02). Die Inokulation der Blätter erfolgte mit Sporen entweder in Gamborg-Minimalmedium mit 25 mM Glucose (GB5), oder mit Malzextrakt-Vollmedium (ME).

### 4.4.2 Der Infektionsdefekt der VELVET-Mutanten ist auf Ackerbohne schwächer ausgeprägt als auf Tomate

Auf Ackerbohnenblättern zeigte sich ein schwächerer Virulenzdefekt der VELVET-Mutanten. Alle Mutanten waren in der Lage Sekundärläsionen zu bilden, die jedoch im Vergleich zum *B. cinerea* Wildtyp kleiner waren (Abb. 32A). VELVET-Mutanten alkalisierten das Gewebe wie bei der Infektion von Tomatenblättern (Abb. 32B). Die Inokulation mit Vollmedium förderte weder die Läsionsausbreitung noch führte sie zur Absenkung des pH-Werts im Infektionsverlauf (Daten nicht gezeigt). Demnach spielt der pH-Wert auf *V. faba* (anders als auf Tomate) keine Rolle für die Entwicklung von Sekundärläsionen. Da die VELVET-Mutanten bei höherem pH auf Ackerbohnenblättern jedoch im Vergleich kleinere Läsionen bildeten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein optimaler pH-Wert (ca. pH 5,8) die Größe der Läsionen positiv beeinflusst.



**Abb. 32: Infektionsdefekt der VELVET-Mutanten auf Ackerbohnenblättern.**

Die Inokulation der Blätter erfolgte mit Sporen in Gamborg-Minimalmedium mit 25 mM Glucose. (A) Radiale Läsionsausbreitung (72 h). (B) pH-Verlauf in Inokulationstropfen.

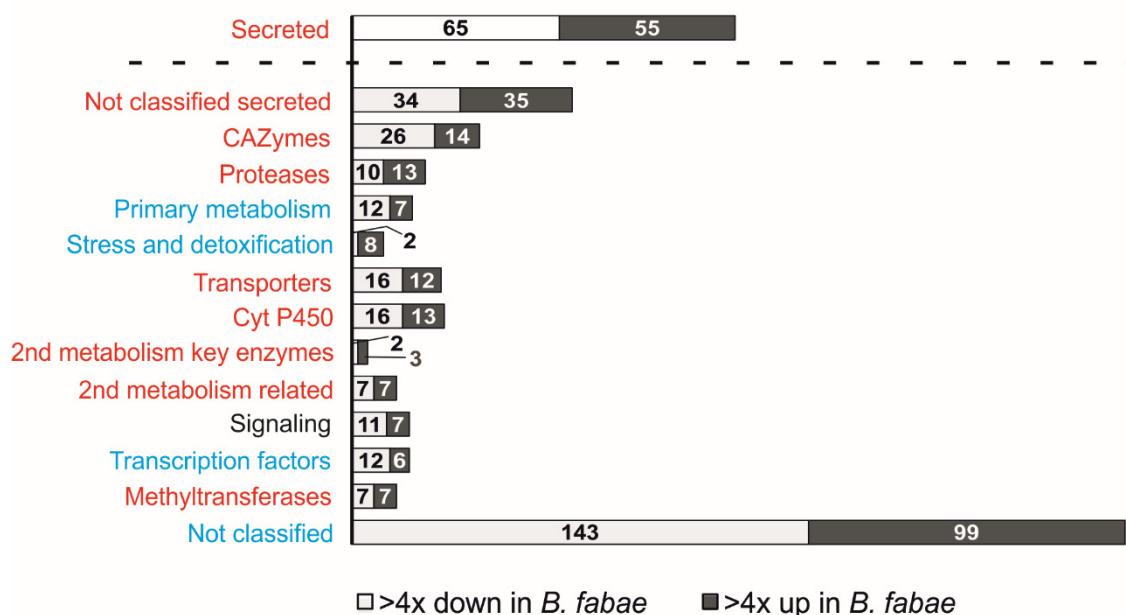
#### 4.4.3 Das *B. fabae* Transkriptom: Differenzielle Genexpression während der Infektion von *V. faba*

Mittels vergleichender Genomanalysen können artspezifische Gene identifiziert werden, die bedeutend für die Unterschiede in der Virulenz der beiden Arten sein könnten. So wurde die Genomsequenz des *B. fabae* Stamms 11002 im Vorfeld in dieser Arbeitsgruppe sequenziert und mit Sequenzen von *B. cinerea* und von weiteren *Botrytis*-Arten verglichen. *B. cinerea* und *B. fabae* sind innerhalb der *Botrytis* Klade 1 am nächsten miteinander verwandt und zeigen in den codierenden Gensequenzen lediglich eine Diversität von 2-3%. (Plesken, 2014). Im Rahmen einer vergleichenden Genomanalyse wurden *B. fabae* spezifische Gene identifiziert, jedoch konnten vielen Genen keine Funktion zugeordnet werden (Stephenson, 2015). Da nicht unbedingt die Präsenz von Genen eine Rolle spielt, sondern vielmehr deren Expression beispielsweise über die Differenzierung und Pathogenese entscheiden, wurden im Rahmen dieser Arbeit Transkriptom-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Ackerbohnenblätter mit dem *B. cinerea* Stamm B05.10 und dem *B. fabae* Stamm 11002 infiziert, nach 48 h Inkubation eine RNA-Präparation durchgeführt und die RNA sequenziert. Zunächst konnten mithilfe der RNAseq Transkriptomdaten die *B. fabae* spezifischen Gene weiter eingegrenzt werden, beispielsweise konnten mithilfe des Mappings auf die *B. cinerea* Referenzsequenz weitere eindeutig homologe Gene identifiziert werden. Die spezifisch in *B. fabae* vorkommende Gene codieren in der Mehrzahl für Proteine unbekannter Funktion und nur ca. 30% sind während der Infektion exprimiert (Könnel, 2016). Insgesamt wurden 39 *B. fabae* spezifische, während der Infektion tatsächlich exprimierte Gene (RPKM>1) identifiziert, von denen lediglich 13 eine putative Funktion zugeordnet werden. Keines der spezifisch in *B. fabae* vorkommenden Gene kodierte für ein *in silico* sekretiertes Protein

## Ergebnisse

(Könnel, 2017). Spezifisch im Genom von *B. cinerea* vorkommende Gene wurden in dieser Arbeit nicht thematisiert.

Im folgenden Abschnitt wurde ausschließlich die differenzielle Expression der gemeinsamen Gene von *B. cinerea* und *B. fabae* untersucht. Bei der Infektion von *V. faba* wurden im Vergleich der beiden Spezies 529 mehr als vierfach differenziell exprimierte Gene identifiziert (RNAseq-Tabelle). Auffällig waren die großen Unterschiede bei der Expression von Genen, die für sekretierte Proteine insgesamt, sowie für CAZymes und Proteasen codieren. Das Verhältnis der in einer der beiden verglichenen Spezies unter- und überexprimierten Gene dieser Gruppen war gleichmäßig verteilt, nur CAZymes waren in *B. fabae* tendenziell schwächer exprimiert (Abb. 33). Weitere angereicherte Gruppen differenziell exprimierter Gene waren solche für Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus, sowie mit Sekundärmetabolismus in Verbindung stehende Proteine wie Methyltransferasen, Cytochrom P450 Monooxygenasen, und Transporter.



**Abb. 33: Funktionelle Klassifizierung der 529 zwischen *B. fabae* und *B. cinerea* auf Ackerbohne (48 h) differenziell exprimierten Gene.**

Dargestellt ist jeweils die Anzahl der in den Klassen differenziell exprimierten (RPKM>5) Gene. Die signifikante ( $p < 0,01$ ) Überexpression (rot) oder Unterexpression (blau) in *B. fabae* von einer Klasse im Vergleich zu allen exprimierten Genen ist farbig markiert. Gene, die für sekretierte Proteine codieren, sind als separate Kategorie aufgeführt, die Schnittmengen mit anderen Klassen aufweist.

Die Expression verschiedener Virulenz-assoziiierter Gene zeigte deutlich niedrigere mRNA-Level in *B. fabae* im Vergleich zu *B. cinerea*, z.B. für die Gene *ara1*, *nep1*, *nep2*, *pg1*, *pg2*, *Xyn11A*, *pme1* und *pme2*. Das für eine saure Protease codierende *acp1* und *spl1* (codierend für Cerato-platanin) waren dagegen in *B. fabae* stärker exprimiert (RNAseq Tabelle; Könnel, 2017).

#### 4.4.4 Qualitative Vergleiche der *B. cinerea* und *B. fabae* Sekretome auf Tomate und Ackerbohne

Um Unterschiede im Sekretom der beiden unterschiedlichen Spezies in Bezug auf die Wirtsspezifität zu analysieren, wurden die Sekretome von *B. cinerea* und *B. fabae* während der Infektion auf Tomaten- und Ackerbohnenblättern untersucht. Hierzu wurden Proteine aus 48 h *on planta* Exudaten isoliert und mittels MS/MS analysiert. Es wurde eine Tabelle mit allen *B. cinerea*- und *B. fabae*-Proteinen erstellt, in der die durch Blast-Analyse zugeordneten orthologen Proteine nebeneinander gelistet sind. Hierfür wurden die vorhergesagten Proteine des Velvet-Assemblys des *B. fabae* Stamms 11002 (Plesken, 2014) und die neuesten Proteinsequenzen von B05.10 (<http://fungi.ensembl.org>) verwendet. Zusätzlich enthält die Liste u.a. Informationen über putative Funktionen, Klassifizierung in funktionelle Gruppen und Vorhersagen ob ein Protein sekretiert ist. In diese Liste wurden die in der MS/MS-Analyse ermittelten „peptide ion intensities“ integriert. Die Tabelle kann beispielsweise nach *in silico* sekretierten und nicht sekretorischen Proteinen gefiltert werden und ermöglicht den direkten Vergleich der Sekretome von *B. cinerea* und *B. fabae* (Sekretomtabelle C). Es konnten insgesamt 114 *Botrytis*-Proteine identifiziert werden, die in allen vier Bedingungen in beiden Spezies gemeinsam vorkamen. Die Anzahl der sekretorischen Proteine war vergleichbar, wenn auch bei *B. fabae* auf Ackerbohne tendenziell geringer. Auffällig war im Vergleich die hohe Anzahl an nicht-sekretierten *B. fabae* Proteinen während der schwachen Infektion auf Tomatenblättern (Tab. 5). Es wurde deutlich, dass die Gesamtmenge aktiv sekretierter Proteine bei *B. fabae* in der Nicht-Wirts-Interaktion geringer ist als bei den übrigen erfolgreichen Infektionen.

**Tab. 5: Nachweis von *Botrytis*-Proteinen in den Sekretomen von *B. cinerea* und *B. fabae*.**

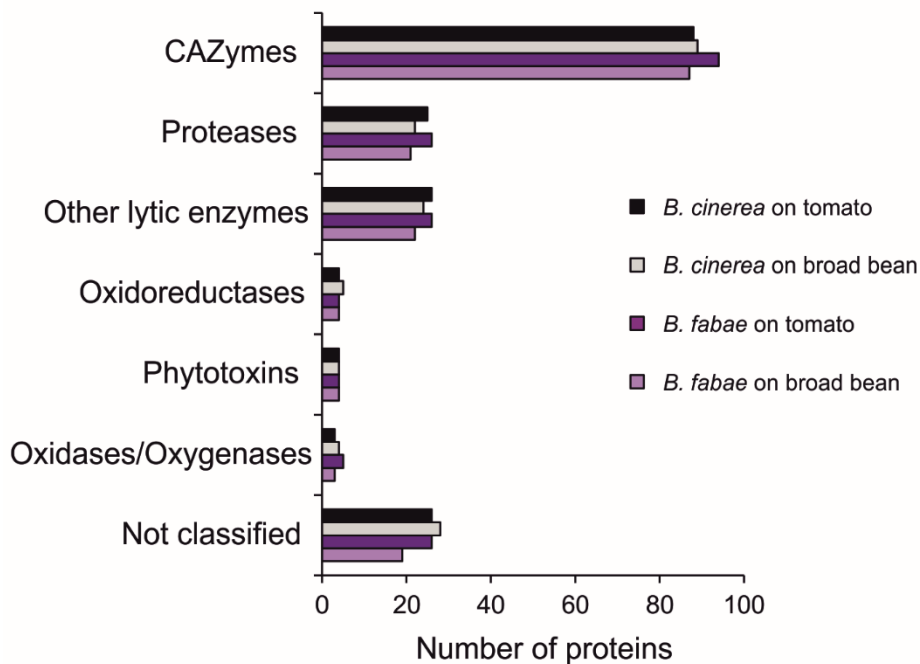
Gezeigt ist die Anzahl der *in silico* als sekretiert bzw. nicht sekretiert eingestuft Proteine in den Sekretomen von *B. cinerea* und *B. fabae* auf Tomaten- bzw. Ackerbohnenblättern. Common: in allen Bedingungen beider Spezies identifiziert.

	<i>B. cinerea</i>		<i>B. fabae</i>		Common
	Tomato	Broad bean	Tomato	Broad bean	
Secreted	176	176	185	160	114
Non secreted	4	6	79	17	2

Die qualitative Zusammensetzung der sekretierten *Botrytis*-Proteine wurde bzgl. des Vorkommens funktioneller Gruppen analysiert. In allen Sekretomen machten CAZymes ca. 50% aller sekretierten Proteine aus, auch Proteasen und andere lytische Enzyme waren mit jeweils ca. 13-15% in allen Sekretomen abundant vertreten (Abb. 34). Die hier durchgeführte qualitative MS/MS-Analyse ohne Normalisierung der Werte ist nicht dazu geeignet signifikante quantitative Unterschiede zu ermitteln, jedoch können die in der Massenspektroskopie gemessenen „peptide ion intensities“ erste Hinweise auf die relative Abundanz von Proteinen liefern. Im Allgemeinen waren diejenigen Proteine im *B. fabae*

## Ergebnisse

Sekretom, deren Gene schwächer als in *B. cinerea* exprimiert waren, auch weniger häufig zu finden (Könnel, 2017), eine quantitative Korrelationsanalyse steht jedoch noch aus.



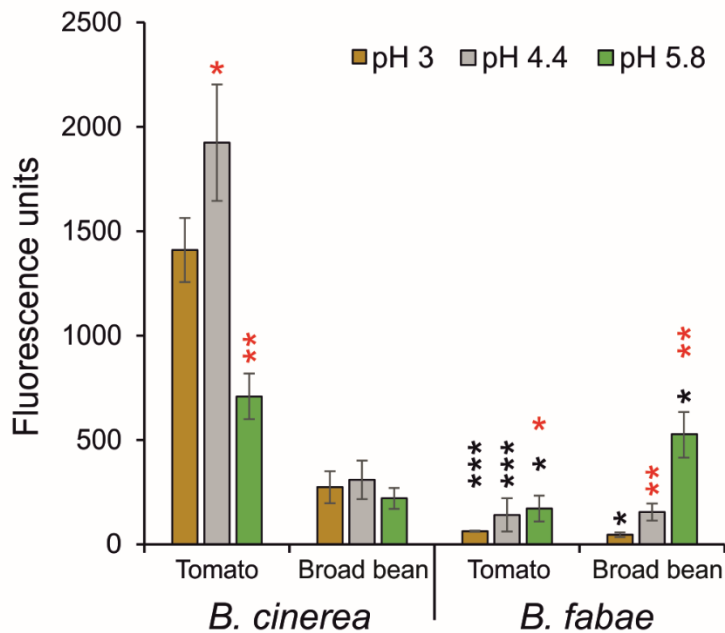
**Abb. 34: Funktionelle Klassifizierung sekretierter *B. cinerea*- und *B. fabae*-Proteine auf verschiedenen Wirtspflanzen.**

Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der in der MS/MS-Analyse identifizierten sekretierten *Botrytis*-Proteine, die in mindestens 2 Replikaten der jeweils analysierten Bedingung (48 h *on planta*) nachgewiesen wurden.

Auf *V. faba* war das bei beiden Spezies auf Basis der „peptide ion intensities“ abundanteste Protein die Aspartylprotease Ap8. Die 25 abundantesten *B. fabae*-Proteine wurden auch im *B. cinerea* Sekretom auf Bohne gefunden. Das gleiche galt umgekehrt auch für die 25 abundantesten *B. cinerea* Proteine, einzig die Pektinmethylesterase Pme1 war in *B. fabae* deutlich schwächer sekretiert. (Sekretomtable C). Alle spezifisch durch *B. fabae* sekretierten Proteine (u.a. 15 CAZymes, acht lytische Enzyme und zwei Serin-Proteasen) waren jedoch im Vergleich zu anderen Proteinen, außer einer Pektatlyase (Bcin07g02730), nur sehr schwach sekretiert (Sekretomtable C). Die meisten *B. fabae* spezifisch sekretierten Proteine sind aufgrund der niedrigen Abundanz wahrscheinlich nicht für die stärkere Aggressivität auf Bohne relevant, die gefundene spezifisch sekretierte Pektatlyase könnte jedoch die bessere Infektion von *B. fabae* auf Ackerbohne beeinflussen. In Vortests zeigten die beiden Spezies keine unterschiedliche Pektinaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Im quantitativen Vergleich stellten sich u.a. 17 CAZymes, acht lytische Enzyme und sechs Serin-Proteasen auf Tomatenblättern als *B. cinerea* spezifisch sekretiert heraus, (Sekretomtable C). Tatsächlich konnte für *B. fabae* im Vergleich auf Tomate eine signifikant niedrigere Proteaseaktivität gezeigt werden. Auf Ackerbohne war die Proteaseaktivität von *B. cinerea* deutlich niedriger als auf Tomate, aber immer noch höher

## Ergebnisse

als von *B. fabae* (Abb. 35). Eine Messung bei pH 5,8, wie er bei der Infektion der Ackerbohne gemessen wurde, konnte die Proteaseaktivität von *B. fabae* signifikant steigern. *B. cinerea* Exudate zeigten die höchste Aktivität bei pH 4,4, die Erhöhung auf pH 5,8 reduzierte die Aktivität in *B. cinerea* Tomaten-Exudaten deutlich (Abb. 35). Die höhere Proteaseaktivität bei pH 5,8 in *B. fabae* im Vergleich zu *B. cinerea* in Exudaten von *V. faba* korreliert mit der aggressiveren Läsionsausbreitung des Wirtsspezialisten.



**Abb. 35: Proteaseaktivität in *B. cinerea* und *B. fabae* on planta Exudaten.**

Relative Proteaseaktivitäten im Vergleich der Inokulation auf Tomate und Ackerbohne sind als Fluoreszenzintensität dargestellt, welche die Proteolyse des Substrats anzeigt. Signifikante Abweichungen im Vergleich der beiden Spezies sind schwarz ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,001$ :\*\*\*), signifikante Abweichungen zwischen Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten rot gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*).

## 5. Diskussion

### 5.1 Identifizierung neuer Komponenten des BMP1-MAPK-Signalwegs

Anders als in Hefe sind die beiden stark konservierten Plasmamembran-Sensorproteine Msb2 und Sho1 in vielen pathogenen Pilzen vom Hog1-MAP-Kinase-Signalweg entkoppelt und aktivieren stattdessen Fus3/Kss1 orthologe MAP-Kinasen. Sie steuern dabei die Erkennung von Pflanzen- und Oberflächensignalen, die Appressorienbildung, Penetration und Virulenz. Dabei sind sie oft nicht wie in Hefe für die generelle Stressantwort verantwortlich (Liu et al., 2011b; Lanver et al., 2014; Pérez-Nadales und Di Pietro, 2015). Msb2 und Sho1 können dabei wie in *F. oxysporum* redundante Funktionen übernehmen (Pérez-Nadales und Di Pietro, 2011).

In dieser Arbeit lag ein Fokus auf der Untersuchung der Funktion von Sho1 in *B. cinerea*. Die bereits charakterisierte *msb2* Mutante (Leroch et al., 2015) wurde zum Vergleich mit der *sho1* und der *msb2/sho1* Doppelmutante in die Analysen miteinbezogen. Alle drei Mutanten zeigten auf GB5 Minimalmedium gleichermaßen eine Reduzierung des vegetativen Wachstums gegenüber dem Wildtyp. Auf Vollmedium wurden keine Wachstumsdefekte beobachtet. Es konnte für *sho1* Mutanten keine höhere Empfindlichkeit gegenüber Zellwand-Stress wie in *Candida albicans* (Roman et al., 2005) und *F. oxysporum* (Pérez-Nadales und Di Pietro, 2015), oder gegenüber oxidativem Stress wie in *Aspergillus fumigatus* (Ma et al., 2008) beobachtet werden. Auffällig war bei allen drei Mutanten die deutliche Stimulierung des Wachstums im Vergleich zum Kontrollmedium durch osmotische Stabilisierung des Mediums mit 0,7 M Sorbitol. Osmotischer Stress führte jedoch zu einer vergleichbaren Inhibierung des Wachstums wie beim Wildtyp, was eine Rolle von Sho1 und Msb2 in der Regulation von Osmo-Stress unwahrscheinlich macht. Längere und früher gebildete Keimschläuche, teilweise in korkenzieherartiger Form, geben zusammen mit einer verringerten Gesamtanzahl an Appressorien Hinweise auf einen Oberflächen-erkennungsdefekt der *sho1* Mutante. Entgegen des Phänotyps der *msb2* Mutante bildete *sho1* verstärkt infection cushions. Die Penetrationsfähigkeit auf Zwiebelepidermen war im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 9). Der Penetrationsdefekt wirkte sich nicht auf die Infektion von Tomatenblättern aus und die *sho1* Mutante zeigte im Gegensatz zu *msb2* keine Virulenzdefekte. Die Funktionen von Sho1 und Msb2 lassen sich daher deutlich voneinander abgrenzen und Sho1 spielt kaum eine Rolle bei der Infektion. Dennoch zeigte die *msb2/sho1* Doppelmutante eine stärker reduzierte Expansion im Gewebe als die *msb2* Mutante. Diese konnte anders als bei *msb2* nur teilweise durch die Verwundung des Blattes aufgehoben werden (Abb. 11). Sho1 beeinflusst daher zusammen mit Msb2 die Ausbreitung von Läsionen. In *M. oryzae* scheinen Msb2 und Sho1 ähnliche Funktionen zu erfüllen wie in *B. cinerea*. Auch hier beeinflusst *msb2* die Virulenz, während *sho1* Mutanten dem Wildtyp



ähneln. Doppelmутanten zeigten wie in *B. cinerea* additive Defekte. Msb2 ist in *M. oryzae* für die Perzeption hydrophober Oberflächen und Cutin-Monomere verantwortlich, Sho1 scheint eher eine Rolle bei der Erkennung von Wachsen der Blattoberfläche zu spielen (Liu *et al.*, 2011b). Um zu überprüfen ob Sho1 wie Msb2 (Leroch *et al.*, 2015) einen Einfluss auf die BMP1-Aktivierung hat, wurden Phosphorylierungsstudien durchgeführt. Die Deletion von *sho1* beeinflusste die Phosphorylierung von BMP1 jedoch kaum. Eine direkte Interaktion von Sho1 mit BMP1, wie sie in *U. maydis* zwischen Sho1 und der MAPK Kpp6 gezeigt wurde (Hamel *et al.*, 2012), konnte nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde in Yeast two-hybrid Experimenten sowohl eine Interaktion zwischen Msb2 und BMP1, als auch zwischen Msb2 und Sho1 gezeigt werden (Abb. 13). Eine direkte Interaktion der beiden Sensorproteine ist bereits für Proteine aus *S. cerevisiae* bekannt (Cullen *et al.*, 2003). Da beide Interaktionen jedoch nur in eine Richtung zwischen Bait und Prey nachgewiesen wurden gilt es diese mithilfe anderer Interaktionsstudien zu bestätigen. Es wurden keine Interaktionen von Sho1 mit anderen Proteinen der BMP1-MAPK-Kaskade gezeigt. Insgesamt kann aus den Versuchen abgeleitet werden, dass Msb2 in Hinblick auf die pathogene Differenzierung und die Aktivierung der BMP1-MAPK eine deutlich größere Bedeutung hat, beides wird jedoch zusätzlich in geringerem Maße auch von Sho1 beeinflusst.

Viele der Gene, welche für Zellwand-abbauende oder andere lytische Enzyme codieren, sind in *B. cinerea* während der Keimungsphase induziert und in der *bmp1* Mutante herunterreguliert. Die *bmp1* Mutante weist multiple Defekte in der Keimung (Doehlemann *et al.*, 2006), der sexuellen Differenzierung und der Bildung von Infektionsstrukturen auf, und ist apathogen (Zheng *et al.*, 2000; Schamber *et al.*, 2010). Der Transkriptionsfaktor Ste12 wird durch die BMP1-MAPK kontrolliert und zeigt in mehreren pathogenen Pilzen einen Einfluss auf die Virulenz (Schamber *et al.*, 2010, Wong und Dumas, 2010). *B. cinerea ste12* Mutanten bilden deformierte Appressorien und infection cushions, sie sind in der Penetration beeinträchtigt, bilden jedoch Sekundärläsionen auf Tomatenblättern (Schamber *et al.* 2010). Die Deletion von zwei weiteren durch BMP1 regulierten Transkriptionsfaktoren hatte keine phänotypischen Auswirkungen (Leroch *et al.*, 2013). Die Zielgene, die die gravierenden Defekte der *bmp1* Mutante verursachen sind daher noch unbekannt. Auch in dieser Arbeit zeigte die individuelle Deletion BMP1-abhängiger Gene, bis auf eine Ausnahme, keine Defekte in der Keimung, dem Wachstum oder der Virulenz. Die Redundanz putativer Virulenzfaktoren (vgl. Tab. 1) erschwert die funktionelle Analyse einzelner Proteine in *B. cinerea* und kann erklären warum die Deletion vieler BMP1-regulierter Gene keine phänotypischen Änderungen verursacht. Im *B. cinerea* Genom codieren neben dem in dieser Arbeit deletierten *plc1* noch sechs weitere Gene für Pektatlyasen, zusätzlich zu *cel1* gibt es sieben weitere Gene für GH7-Glycohydrolasen. Obwohl beide deletierten Gene eine starke *in planta* Induktion zeigen, könnte die Deletion so durch die anderen Proteine kompensiert

## Diskussion

worden sein. Gleiches gilt für die Lysophospholipase *Lpl1* (drei Kopien im Genom) und die Chitin-Deacetylase *Cda1* (elf Kopien im Genom). Während *cda1* das während der Keimung am stärksten induzierte Gen war (Leroch *et al.*, 2013), zeigten *lpl1* und *cda1* keine Expression *in planta*. Die  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase *Af1*, für die keine weiteren Isoformen im *B. cinerea* Genom existieren, zeigte ebenfalls eine deutliche *in planta* Induktion und stellte ein im *B. cinerea* Sekretom abundantes Protein dar. In *M. oryzae* wurde eine  $\alpha$ -N-Arabinofuranosidase als neuer Virulenzfaktor verifiziert (Wu *et al.*, 2016), die *af1* Deletionsmutante in *B. cinerea* zeigte jedoch keine Unterschiede zum Wildtyp. Einige der bisher in *B. cinerea* identifizierten Virulenzfaktoren, abgesehen von regulatorischen Proteinen, sind ebenfalls Zellwand-abbauende Enzyme. Für diese wurde lediglich eine niedrige bis mittlere Relevanz für die Infektion gezeigt (vgl. Tab. 1), die auch auf deren Redundanz zurückgeführt werden kann. Nekrotrophe Pathogene sekretieren nur sehr selten Effektorproteine (Zhu *et al.*, 2014), welche beispielsweise von biotrophen und hemibiotrophen Pilzen sekretiert werden um das pflanzliche Immunsystem zu unterwandern und beispielsweise vor der Erkennung durch die Pflanze zu schützen (Lanver *et al.*, 2014). Bisher sind keine solchen Effektorproteine für *B. cinerea* bekannt, und auch eine bioinformatische Suche nach Genen für Effektorproteine im *B. cinerea*-Genom blieb ohne Erfolg (Amselem *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde die Funktion von drei putativen Effektorproteinen analysiert. Das LysM-Protein *Gis1* wurde als putativer Effektor ausgewählt, da sekretierte LysM-Proteine in anderen Pflanzenpathogenen wie z.B. *Cladosporium fulvum* beschrieben wurden. Mithilfe ihrer Bindung an Chitin verhindern sie die Erkennung durch die Pflanze und schützen zusätzlich vor dem Abbau durch pflanzliche Chitinasen (Kombrink und Thomma, 2013). Die Funktion des Cystein-reichen, Hydrophobin-ähnlichen Proteins *Gis2* (Mosbach *et al.*, 2011) und eines sekretierten Proteins mit einer Cellulose-Bindedomäne waren unbekannt. Die Expressionslevel *in planta* waren bei allen drei Kandidatengenen sehr gering. Auch die Deletion zweier Gene, die für cytosolische Proteine codieren, und eines großen Membranproteins ließen keine Rückschlüsse auf Funktionen zu.

Ein während der Keimung induziertes Gen kodiert für ein 220 Aminosäuren großes cytosolisches Ankyrin-repeat Protein (*Arp1*) und ist sowohl in der *bmp1*, als auch in der *msb2* Mutante herunterreguliert. Ankyrin-repeats gelten als Protein-Protein-Interaktionsmodule und sind an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt (Mosavi *et al.*, 2004). Mutanten des Orthologs in Hefe zeigten u.a. Defekte im filamentösen Wachstum und den Verlust invasiven Wachstums (Giaever *et al.*, 2002). Deletionsmutanten in *B. cinerea* waren im vegetativen Wachstum und der Sporulation stark eingeschränkt. Im Gegensatz dazu zeigten *arp1* Mutanten übermäßiges aberrantes Wachstum während der frühen Hyphendifferenzierung. Die Keimung erfolgte sogar unabhängig von Zucker auf einer hydrophilen Oberfläche, während Sporen des Wildtyps nicht keimten (Daten nicht gezeigt). Insgesamt weisen die

## Diskussion

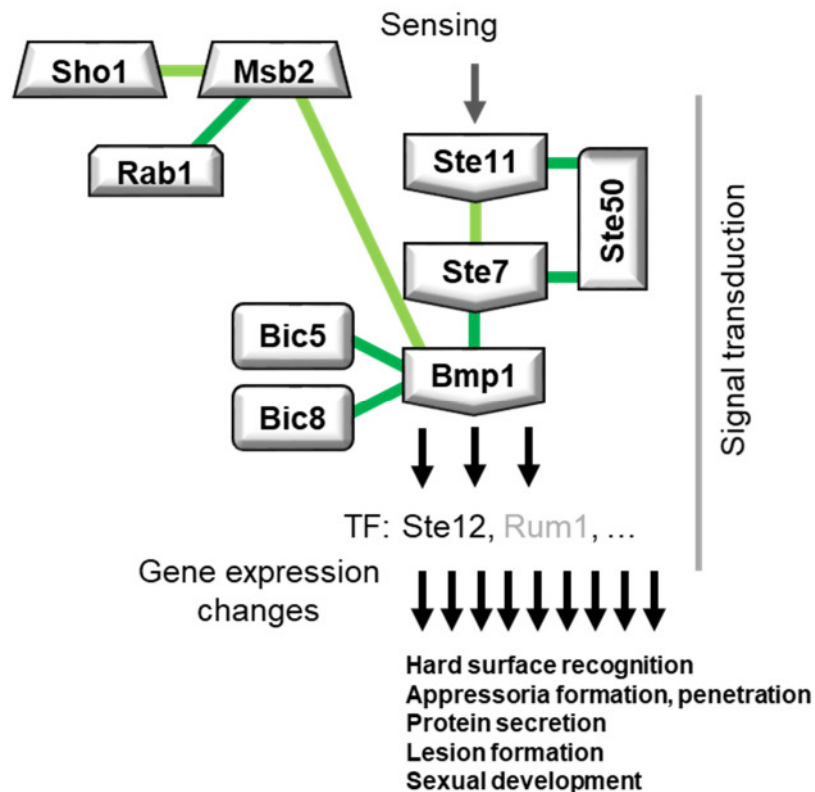
gravierenden Defekte in der Keimungsphase auf einen Defekt in der Erkennung der physikalischen Eigenschaften der Oberfläche hin. In Infektionstests mit Myzelstückchen war die Mutante apathogen. Obwohl bei Inokulation mit Sporen Sekundärläsionen auf Tomate gebildet wurden, konnten verwundete Äpfel nicht infiziert werden. Diese Beobachtung ähnelt dem für die  $\beta$ -Glucosidase BcSUN1 beschriebenen Infektionsphänotyp. Die geringere Virulenz der *sun1* Mutante bei Inokulation mit Myzelplugs und nicht mit Sporen wird hier der reduzierten Anhaftung an der Oberfläche zugeschrieben. Weitere Analysen während der Keimung könnten die gestörte Oberflächenerkennung, sowie z.B. Abwaschungsversuche mögliche Defekte in der Hyphenadhäsion weiter aufklären.

Zwei mit BMP1 interagierende Proteine wurden ebenfalls mithilfe von Deletionsmutanten auf ihre Funktion hin überprüft. Beide Gene sind während der Keimungsphase induziert. Die Deletion des Homologs von *bic5* führte in *M. oryzae* zur Bildung abnormer wenig funktioneller Appressorien und einem daraus resultierenden Virulenzdefekt (Zhang *et al.*, 2011) In *B. cinerea* zeigte die *bic5* Mutante jedoch keinen Phänotyp. Das Gen *bic8* kodiert für einen putativen NmrA-ähnlichen Transkriptionsfaktor. Trotz seiner starken Expression während der Kolonisierung des Wirtsgewebes (frühere Benennung *BcPIO2* in Gioti *et al.*, 2006), zeigte auch die Deletion dieses Gens keinen Einfluss auf Wachstum oder Virulenz.

Die über einen cDNA-Datenbank Screen als Interaktionspartner von Msb2 identifizierte Rab1-GTPase ist ein interessanter neuer Baustein im komplexen Signaltransduktionsnetzwerk von *B. cinerea*. Orthologe dieses Proteins sind in filamentösen Pilzen in die Sekretion von Proteinen involviert (Lee *et al.*, 2001; Saloheimo *et al.*, 2003; Siriputthaiwan *et al.*, 2004). Die Überexpression eines dominant-negativen Allels des Orthologs in *C. albicans* inhibierte neben dem Wachstum zusätzlich die Sekretion von Aspartylproteasen, die in *B. cinerea* die hauptsächliche Proteaseaktivität ausmachen (Lee *et al.*, 2001; Espino *et al.*, 2010; Abb. Anhang 12). Eine weitere Rab-GTPase ist bereits als Virulenzfaktor in *B. cinerea* identifiziert worden (Zhang *et al.*, 2014). Eine Deletion des Gens könnte jedoch wie in *C. albicans* letal sein. Die funktionelle Analyse eines weiteren mit Msb2 interagierenden Proteins (Clis-N), welches ebenfalls im cDNA-Datenbank screening identifiziert wurde blieb ohne Erfolg, da die Mutante sich in allen Tests wie der Wildtyp verhielt. Es sind keine Funktionen dieses Proteins aus anderen Pilzen bekannt.

Die Analysen in dieser Arbeit identifizierten neue Komponenten in Verbindung mit der BMP1-MAPK-Kaskade (Abb. 36). Die Aktivierung der Kaskade konnte bisher nur durch Msb2 gezeigt werden, der Einfluss von Sho1 ist nur gering. Die Analysen zeigen, dass BMP1 in Abhängigkeit von Oberflächensignalen viele Gene kontrolliert, die vor allem auch für sekretierte Proteine codieren. Die durch BMP1 regulierten Gene sind anscheinend für unterschiedliche Differenzierungswege wichtig und spielen nicht notwendigerweise eine Rolle während der Infektion. Die BMP1-MAPK-Kaskade reguliert auch die Expression

Virulenz-assoziiierter Gene, deren genaue Bedeutung für die Pathogenese bleibt jedoch weiter unklar. Gerade für die funktionelle Analyse der redundanten lytischen Enzyme wäre die Entwicklung von Methoden wie CRISPR-Cas zur multiplen Genausschaltung ein großer Fortschritt.



**Abb. 36: Interaktionsmodell der BMP1-MAPK-Kaskade und assoziierter Proteine in *B. cinerea*.**

Grüne Linien zeigen eine Zusammenfassung der über Yeast two-hybrid ermittelten physikalischen Interaktionen zwischen den Proteinen, hellgrüne Linien zeigen schwache Interaktionen. Verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) wurden bereits mit BMP1 in Verbindung gebracht, die genauen Zielgene, die zum Phänotyp der *bmp1* Mutante beitragen bleiben weiter unbekannt (erstellt nach Müller, 2012 und dieser Arbeit).

## 5.2 Lokalisierung und Interaktion von Proteinen des VELVET-Komplexes

In *A. nidulans* bilden die Proteine VeA und VelB zunächst ein Heterodimer im Cytoplasma. Das  $\alpha$ -Importin KapA vermittelt den lichtabhängigen Transport von VeA-VelB in den Zellkern, wo sich der trimere VELVET-Komplex VelB-VeA-LaeA bildet (Stinett *et al.*, 2007). Anders als in *A. nidulans* ist der Transport von VEL2 in *B. cinerea* nicht von VEL1 abhängig. Die Kernlokalisierungen sowohl von VEL2, als auch LAE1 werden durch die Deletion von *vel1* nicht beeinflusst (Schumacher *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch das Fehlen von VEL2, welches in *B. cinerea* anstelle von VEL1 ein eindeutiges NLS trägt (Schumacher *et al.*, 2012), keinen Einfluss auf die Lokalisierung GFP-fusionierter Derivate von VEL1 und LAE1 hat (Abb. 17A). Ob ein VEL1-VEL2 Heterodimer im Cytosol

## Diskussion

entsteht, bevor im Nukleus das Heterotrimer VEL2-VEL1-LAE1 assoziiert, bleibt unklar. Es konnte in Yeast two-hybrid Analysen gezeigt werden, dass VEL1 sowohl mit LAE1, als auch VEL2 interagiert (Yang *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2015) und damit wie bereits für *A. nidulans* gezeigt eine Brücke zwischen den beiden anderen Proteinen bildet (Park *et al.*, 2012). Die Analyse von verkürzten *B.cinerea* VEL1-Varianten zeigte, dass die Proteine VEL1<sup>1-184</sup> (T4-Stamm) und VEL1<sup>1-100</sup> (1750-Stamm) weder mit VEL2 noch mit LAE1 interagieren und keine Kernlokalisierung erfolgt (Schumacher *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu zeigte das VEL1<sup>1-538</sup> Protein der *vel1\** Mutante zwar ebenfalls keine Interaktion mit LAE1, die Assoziation mit VEL2 und die eindeutige Kernlokalisierung blieben jedoch erhalten (J. Schumacher, unveröffentlicht; Abb. 17B). Damit konnte gezeigt werden, dass der 37 Aminosäuren lange C-Terminus von VEL1 für die Interaktion mit LAE1 wichtig ist, jedoch nicht für die Kernlokalisierung benötigt wird (Abb. 37).

VEL1 variants	interact with		Nuclear localization
	VEL2	LAE1	
VEL1 <sup>B05.10</sup> VELVET 1-575 aa	+	+	+
VEL1 <sup>T4</sup> VELVE 1-184 aa	-	-	-
VEL1 <sup>1750</sup> VE 1-100 aa	-	-	-
VEL1 <sup>*</sup> VELVET 1-538 aa	+	-	+

**Abb. 37: Interaktionen und Lokalisierungen der VEL1 Proteinvarianten *B. cinerea*.**

Zusammenfassung der Interaktions- und Lokalisierungsstudien aus Yang *et al.*, 2013, Schumacher *et al.*, 2015, und dieser Arbeit.

### 5.3 Phänotypische Vergleiche zeigen deutliche Unterschiede zwischen VELVET-Mutanten

Alle in dieser Arbeit charakterisierten Mutanten sind in dem B05.10 Wildtyp Stamm generiert worden. Wachstumsvergleiche zeigten eine Reduktion des radialen Myzelwachstums aller Mutanten, der Effekt war jedoch bei *vel2* am stärksten ausgeprägt. Eine bereits zuvor für *vel1* und *lae1* gezeigte höhere Empfindlichkeit gegenüber alkalischem pH in Wachstumsplatten (Schumacher *et al.*, 2015) konnte ebenfalls für *vel1\** und *vel2* bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die VELVET-Mutanten außer *vel3* waren unter den untersuchten Bedingungen nicht in der Lage Sklerotien zu bilden. *vel1* und *vel2* Mutanten bestätigten die bereits beschriebene massive Produktion von Konidien im Dunkeln (Yang *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2015), *vel1\** und *lae1* hingegen bildeten im Dunkeln kaum Konidien. Diese Daten weisen darauf hin, dass das in *lae1* vorhandene Heterodimer VEL1-VEL2 und auch die Interaktion zwischen VEL2 und dem verkürzten VEL1<sup>1-538</sup> auszureichen scheint, um die Konidienbildung im Dunkeln zu unterdrücken (Abb. 18C; vgl. Abb. 38). Im Gegensatz zu den

anderen VELVET-Proteinen ist VEL3 weniger wichtig und die Deletion führte nicht zu für VELVET-Mutanten typischen Defekten. *vel3* war in der Lage Sklerotien zu produzieren, das Wachstum nur leicht reduziert, und es zeigten sich weder Defekte in der Virulenz, noch in der Ansäuerung. In *A. nidulans*, spielt das VEL3 Homolog VelC eine positive Rolle in der Kleistothecienbildung und inhibiert die Konidienbildung (Park *et al.*, 2014). Die Bildung von Sklerotien und gleichermaßen Sporen im Dunkeln durch die *vel3* Mutante sprechen dafür, dass auch VEL3 in *B. cinerea* einen Einfluss auf die Unterdrückung der Konidienbildung hat. Die GFP-Stämme WT::VEL1-GFP und WT::VEL2-GFP zeigten ebenfalls sowohl Sklerotien- als auch Sporenbildung im Dunkeln (Schumacher *et al.*, 2015; Abb. Anhang 5). Dies zeigt, dass bereits kleine Veränderungen wie die Überexpression der Proteine VEL1 und VEL2, die das Gleichgewicht der VELVET-Proteine beeinflussen, deutliche Unterschiede in der Zellantwort verursachen können. Die Existenz eines funktionalen VEL1-VEL2-LAE1 Komplexes ist nicht nur wichtig für das Wachstum und die sexuelle Entwicklung, sondern auch für die Expansion nekrotischer Läsionen, wie die Mutanten *vel1\**, *lae1*, *vel1* und *vel2* bestätigen (Schumacher *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2012, diese Arbeit). Während die Virulenzdefekte bei *vel1\** und *lae1* am deutlichsten ausgeprägt waren, konnten bei *vel1* und weiter verstärkt bei *vel2* sich langsam ausbreitende Sekundärläsionen beobachtet werden. Das bedeutet, dass das Fehlen von LAE1 oder eine Restaktivität des VEL1<sup>1-538</sup> Proteins einen stärkeren Einfluss auf die Virulenz hat, als das Fehlen von VEL1 oder VEL2. Eine Erklärung für die starke Ähnlichkeit der Phänotypen von *vel1\** und *lae1*, bzw. die schwerwiegenden Defekte, könnte die Interaktion von VEL1<sup>1-538</sup> mit anderen Proteinen im Nukleus sein, wie sie z.B. für *A. nidulans* VeA gezeigt worden ist (Sarıkaya-Bayram *et al.*, 2015). Beispielsweise zeigt der Stamm T4 trotz VEL1<sup>1-185</sup> im Gegensatz zur *vel1* Mutante eine normale Melanin-Biosynthese, die Version VEL1<sup>1-100</sup> im Stamm 1750 reicht für die Biosynthese von Bikaverin aus (Schumacher *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer transienten Ansäuerung die Mutanten *vel1\**, *lae1*, *vel1* und *vel2* das Medium im Gegensatz zum Wildtyp auf Werte bis zu pH 7 alkalisierten (Abb. 20). Bei unterschiedlichen nekrotrophen Pilze wie beispielsweise *Penicillium* (Prusky *et al.*, 2004; Hadas *et al.*, 2007) und *Phomopsis* (Davidzon *et al.*, 2010) wurde die Ansäuerung der Umgebung hauptsächlich mit der Produktion von Gluconat in Verbindung gebracht, während sie bei *S. sclerotiorum* (Kabbage *et al.*, 2015) und *B. cinerea* (Kunz *et al.*, 2006; Schumacher *et al.*, 2012) mit der Sekretion von Oxalat korreliert wurde. In mit *B. cinerea* infizierten Sonnenblumenkotyledonen wurde eine Akkumulation von Citrat gezeigt, während Oxalat nur in sehr geringen Mengen und erst spät während der Infektion gemessen wurde (Billon-Grand *et al.*, 2012). Auch bei *Aspergillus niger* kann neben Oxalat zusätzlich Citrat sekretiert werden (Ruijter *et al.*, 1999). In dieser Arbeit war die dominierende vom *B. cinerea* Wildtyp ausgeschiedene Säure Citrat, gefolgt von Malat. Oxalat wurde

## Diskussion

ausschließlich *in vitro* nach späten Zeitpunkten bei hohem Ausgangs-pH produziert. VELVET-Mutanten sekretierten deutlich weniger Citrat, stattdessen wurden im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Mengen Malat gemessen. Eine *A. niger lae1* Mutante zeigte ebenfalls Defekte in der Ansäuerung und sekretierte kein Citrat mehr (Niu *et al.*, 2015). Malat wird in *Aspergillus oryzae* wahrscheinlich mithilfe eines Dicarboxylat-Transporters als Dianion exportiert (Brown *et al.*, 2013), was bedeutet, dass die Sekretion von organischen Säuren nicht notwendigerweise an den Protonenexport gekoppelt sein muss. In Pilzen wurde bisher noch kein Citrat-Efflux-Transporter beschrieben. Es konnte nicht bewiesen werden, dass die Beeinträchtigung der Ansäuerung tatsächlich durch die veränderte Säuresekretion in den VELVET-Mutanten bedingt ist.

Mithilfe der phänotypischen Charakterisierung der Oxalat-defizienten *oahA* Mutante konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Oxalat kein wichtiger Virulenzfaktor für *B. cinerea* ist. Das Fehlen der Oxalacetathydrolase, bzw. von Oxalat, in der *oahA* Mutante verursachte lediglich leichte Ansäuerungsdefekte. Erst nach mehr als drei Tagen konnte eine eindeutige Alkalisierung des Pflanzengewebes beobachtet werden und die Ausbreitung der Nekrosen war nach diesen späten Zeitpunkten beeinträchtigt (Abb. 22). Die Ansäuerung gilt als genereller Mechanismus einiger nekrotropher Pflanzenpathogene, um durch niedrige pH-Optima die Mazeration der Gewebe mithilfe lytischer Enzyme oder anderer Virulenzfaktoren zu fördern (Alkan *et al.*, 2013). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass konstant niedrig gehaltene pH-Werte die Virulenzdefekte der VELVET-Mutanten teilweise aufheben konnten. Ähnliche Effekte wurden auch bereits bei *S. sclerotiorum* demonstriert. Eine *oahA* Mutante, die auf manchen Wirtsgeweben Defekte in der Ansäuerung und Virulenz aufwies, konnte durch niedrigen pH gefördert werden, während die Infiltration mit Oxalat keinen Effekt hatte (Xu *et al.*, 2015). Zusätzlich wurde gezeigt, dass, die Läsionsausbreitung des *B. cinerea* Wildtyps durch artifiziell hohe pH-Werte nicht nur beeinträchtigt, sondern sogar gestoppt werden kann (Abb. 23). Dies beweist, dass die Läsionsausbreitung in Tomatenblättern bei der Infektion mit *B. cinerea* durch einen niedrigen pH gefördert wird.

Eine Abhängigkeit der Ansäuerung von der Glucosekonzentration im Medium, wie sie kürzlich für nekrotische Pilze beschrieben wurde (Prusky *et al.*, 2016), konnte für *B. cinerea* nicht bestätigt werden: Es wurden keine Unterschiede in der Ansäuerung des Mediums im Vergleich von 10 mM bzw. 175 mM Glucose festgestellt. Die von Bi *et al.* (2016) postulierte Hypothese, dass die Bildung von Gluconat bei einigen Pilzen wesentlich für die Ansäuerung des Mediums ist, kann für *B. cinerea* nicht nachvollzogen werden. Gluconat wird mithilfe der Glucose-Oxidase aus Glucose hergestellt. Die Deletion der Glucose-Oxidase *God1* in *B. cinerea* führte nicht zur reduzierten Virulenz (Rolke *et al.*, 2004), der Austausch von Glucose mit Fructose beeinflusste die Ansäuerung weder *in vitro* noch während der Infektion. *B. cinerea* benötigt organische Nährstoffe, vor allem Zucker für eine erfolgreiche Infektion

von intaktem Pflanzengewebe (Benito *et al.*, 1998; Kretschmer *et al.*, 2007; Abb. 30.). Die Inokulation in Vollmedium konnte die Ansäuerung, die Expression Virulenz-assoziiertes Gene und die Läsionsausbreitung der VELVET-Mutanten eindeutig fördern (Abb. Anhang 7), eine Erhöhung der Zuckerkonzentration in Minimalmedium zeigte diese Effekte jedoch nicht (Daten nicht gezeigt).

#### **5.4 Der VELVET-Komplex reguliert auf transkriptioneller Ebene die Sekretion Virulenz-assoziiertes Proteine**

Die Mutanten *vel1\**, *lae1* und *vel1* zeigten eine deutlich größere Anzahl differenziell regulierter Gene als zuvor durchgeführte Microarray-Analysen von *vel1* in *Phaseolus* und *vel1* und *lae1 in vitro* (Schumacher *et al.*, 2012; Schumacher *et al.*, 2015). Das durch VELVET-Mutanten koreguliertes Datenset zeigte eine bemerkenswerte Korrelation mit *in planta* regulierter Expression im Wildtyp. So waren mehr als 65% der in VELVET-Mutanten unterrepräsentierten Transkripte im Wildtyp *in planta* mindestens zweifach hochreguliert im Vergleich zur Expression *in vitro*. Umgekehrt waren 58% der in VELVET-Mutanten überexprimierten Gene im Wildtyp *in planta* herunterreguliert. Daraus kann geschlossen werden, dass der VELVET-Komplex in *B. cinerea* hauptsächlich Gene reguliert, die für die Pathogenese relevant sind. Eine alternative Auswertung der Datensätze mithilfe von DESeq ergab eine noch größere Anzahl differenziell exprimierter Gene. Die zusätzlich als reguliert identifizierten Gene zeigten u.a. weniger als zweifach unterschiedliche Expressionslevel, sie waren häufig sehr schwach exprimiert und kodierten häufig für Proteine mit unbekannter Funktion. Die Datensätze von *vel1\**, *lae1* und *vel1* wurden in dieser Analyse zusätzlich als biologische Replikate einer einzigen Gruppe analysiert und es konnten mehr als 1.000 Gene identifiziert werden die in allen drei Mutanten signifikant koreguliert waren. Hier zeigte sich die Korrelation mit *in planta* regulierten Genen noch deutlicher (Daten nicht gezeigt). Die Betrachtung der funktionellen Gruppen zeigte, dass durch die Deletion von *vel1\**, *lae1* und *vel1* vor allem Gene sekretierte Proteine differenziell exprimiert waren, vor allem für CAZymes, von denen viele eine Rolle beim Abbau pflanzlicher Zellwände spielen (Abb. 25). Eine ähnliche Regulierung Zellwand-abbauender Enzyme konnte auch bereits für eine *lae1* Mutante in *Trichoderma reesei* gezeigt werden (Seiboth *et al.*, 2012).

Da die Genexpression in *B. cinerea* vom pH-Wert beeinflusst wird (Peñalva *et al.*, 2008), könnte der veränderte pH-Wert bei VELVET-Mutanten beispielsweise die Expression der durch sauren pH-Wert induzierten Gene reduzieren. Die künstliche Einstellung niedriger pH-Werte konnte jedoch die Expression Virulenz-assoziiertes und pH-abhängig regulierter Gene bei *vel1\** nicht fördern. Dies bedeutet, dass die Herunterregulation dieser Gene in den VELVET-Mutanten weitgehend unabhängig vom pH-Wert ist (Thoms und Schurig, 2016).



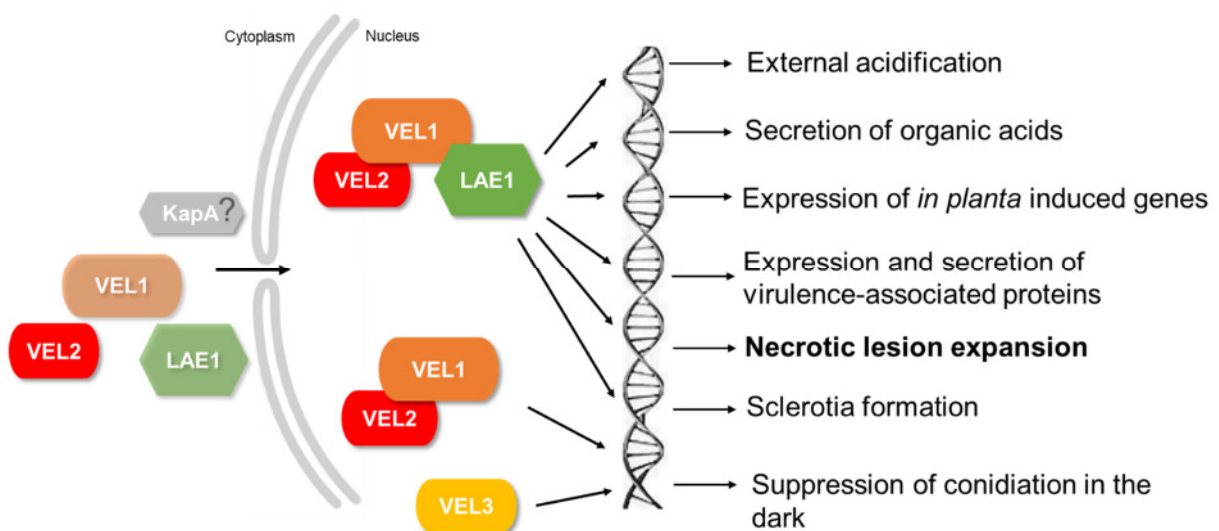
## Diskussion

Die Quantifizierung sekretierter *Botrytis*-Proteine während der Infektion mithilfe von <sup>15</sup>N-Markierung wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal zur Analyse einer Wirts-Parasit-Interaktion eingesetzt. Es konnten insgesamt 174 pilzliche und 141 Pflanzenproteine quantitativ zwischen den Proben verglichen werden. Ein Großteil der sekretierten Proteine, deren Gene in der Transkriptomanalyse herunterreguliert wurden, waren auch im *on planta* Sekretom der VELVET-Mutanten schwächer vertreten oder fehlten. Das deutet darauf hin, dass die mRNA-Level direkten Einfluss auf die Abundanz der Proteine haben. Es konnte festgestellt werden, dass die VELVET-Mutanten insgesamt ca. zweifach weniger Proteine sekretierten als der Wildtyp. Die beiden Gruppen der CAZymes und Proteasen waren besonders stark herunterreguliert (Abb. Anhang 10). Beispiele für regulierte CAZymes waren die Endoxylanase Xyn11A, die sowohl die Pflanzenabwehr induziert, als auch Nekrosen verursacht (Noda *et al.*, 2010), die Polygalakturonasen, Pg3, Pg4 und die als Virulenzfaktor beschriebene Pg1 (ten Have *et al.*, 1998). Gerade CAZymes scheinen in der Phase der Läsionsausbreitung eine besondere Rolle zu spielen, da sie nach 48 h auf Tomatenblättern nahezu 50% der durch *B. cinerea* Wildtyp sekretierten Proteine ausmachen (Abb. 28). Die Akkumulation nicht sekretierter pflanzlicher Proteine im VELVET-Mutanten Sekretom gegenüber dem Wildtyp lässt vermuten, dass die Mutanten nicht in der Lage sind das abgetötete Pflanzengewebe effizient abzubauen und pflanzliche Proteine zu metabolisieren (Tab. 4). Dies lässt sich vor allem mit der Herunterregulierung von Proteasen erklären. Unter den in VELVET-Mutanten deutlich unterrepräsentierten Proteasen, die im Wildtyp-Sekretom in großer Menge gefunden wurden, waren beispielsweise die im Wildtyp-Sekretom oft abundanteste Aspartylprotease Ap8 (Espino *et al.*, 2010), die durch niedrigen pH-Wert induzierte Glutamyprotease ACP1 (Rolland *et al.*, 2009), sowie mehrere Serin- und Metalloproteasen (Abb. 29).

Die reduzierte Sekretion von Proteasen konnte mit einer drastischen Reduzierung der Proteaseaktivität in den Sekretomen der VELVET-Mutanten korreliert werden. Eine Inhibitoranalyse des Wildtyp-Sekretoms zeigte, dass die Proteaseaktivität der Tomaten-Sekretome von *B. cinerea* hauptsächlich durch Pepstatin A gehemmt wird. Das bedeutet, dass die Aktivität größtenteils durch Aspartylproteasen bedingt ist. (Marciniszyn, 1976; Abb. Anhang 12). Die Rolle der Proteasen während der Infektion von *B. cinerea* ist noch nicht geklärt. Mehrere Deletionsmutanten verschiedener Aspartylproteasen zeigen keine Beeinträchtigung in der Virulenz (ten Have *et al.*, 2004; ten Have *et al.*, 2010), es ist jedoch möglich, dass Einzeldelationen durch die Abundanz verschiedener Proteasen kompensiert werden. Bei anderen Pilzen wurde gezeigt, dass Proteasen beispielsweise durch Spaltung pflanzlicher Chitinasen zur Virulenz beitragen können (Jashni *et al.*, 2015). Es wurde für den *B. cinerea* Wildtyp gezeigt, dass die Proteaseaktivität bei neutralen und höheren pH-Werten drastisch sinkt (Manteau *et al.*, 2003; Abb. 35). Die reduzierte Proteaseaktivität der

VELVET-Mutanten, sowie der zusätzlich für *B. cinerea* Proteasen im Infektionsverlauf zu hohe pH-Wert könnte eine der Ursachen für die fehlende Expansion der VELVET-Mutanten in Tomatenblättern sein. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass die Inokulation mit Vollmedium nicht nur die Läsionsausbreitung und die Azidifizierung (siehe oben), sondern auch die Proteaseaktivität bei VELVET-Mutanten steigert.

Insgesamt konnte die Kombination der phänotypischen Charakterisierung, Transkriptom- und Sekretom-Analysen der VELVET-Mutanten im Vergleich zum *B. cinerea* Wildtyp, ebenso wie die Betrachtung des *on planta* Sekretoms des Wildtyps neue Erkenntnisse über den nekrotrophen Infektionsmechanismus von *B. cinerea* liefern. Der VELVET-Komplex ist von zentraler Bedeutung für die Sekretion organischer Säuren, die Ansäuerung des Wirtsgewebes und die Sekretion von Proteinen während der Pathogenese. Zusätzlich ist der VELVET-Komplex beispielsweise im Zusammenspiel mit weiteren VELVET-Proteinen maßgeblich an der Koordination weiterer zellulärer Vorgänge wie der asexuellen und sexuellen Entwicklung beteiligt (Abb. 38).



**Abb. 38: Proteine des VELVET-Komplex in *B. cinerea* steuern unterschiedliche Zellantworten.**

Der VELVET-Komplex VEL2-VEL1-LAE1 steuert im Nukleus maßgeblich verschiedene Prozesse in der Zelle. VEL1-VEL2 und VEL3 regulieren ebenfalls Differenzierungsprozesse, der Einfluss von LAE1 bzw. des Heterotrimer mit LAE1, scheint jedoch von größerer Relevanz zu sein. Es bleibt unklar, ob im Cytosol ein VEL1-VEL2 Heterodimer gebildet wird, bevor sich das Heterotrimer im Zellkern bildet.

## 5.5 Hinweise auf die Ursachen der Wirtsspezifität von *B. fabae*

Trotz einer Übereinstimmung auf Nukleotidebene von 96,8% (Plesken, 2014) unterscheiden sich die beiden Spezies *B. cinerea* und *B. fabae* deutlich in der Morphologie des Wachstums und in ihrem Wirtsspektrum. In Kapitel 5.3 wurde bereits diskutiert, dass pH-Wert und Nährstoffverfügbarkeit essentiell für die Läsionsausbreitung von *B. cinerea* auf Tomatenblättern sind. Für *B. fabae* konnte gezeigt werden, dass die schwache Infektion von Tomatenblättern wie bei VELVET-Mutanten mit einer fehlenden Ansäuerung des Gewebes

korreliert. Die Läsionsentwicklung wird aber durch Einstellen eines artifiziell konstant niedrigen pH-Werts nicht gesteigert, die fehlende Ansäuerung kann also nicht die Ursache für die geringe Virulenz von *B. fabae* auf Tomate sein. Überraschenderweise säuerten während der Infektion von *V. faba* weder *B. cinerea* noch *B. fabae* das Pflanzengewebe an, und der Virulenzdefekt der VELVET-Mutanten war trotz Alkalisierung des Gewebes deutlich abgeschwächt. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Ansäuerung des Gewebes für die erfolgreiche Infektion von Ackerbohne nicht notwendig ist, und dass *B. cinerea* in Bezug auf externe pH-Modulation ein unterschiedliches Verhalten auf den Blättern von Tomaten und von Ackerbohnen zeigt. Studien weisen darauf hin, dass neben dem pH-Wert auch die Pufferkapazität des Wirtsgewebes einen Einfluss auf die Infektion hat (Xu *et al.*, 2015). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass im Gegensatz zu Tomate auf Ackerbohne weder die Läsionsgrößen noch der pH-Verlauf in den Infektionsstellen bei beiden *Botrytis*-Arten durch Zugabe von Vollmedium beeinflusst werden (Abb. 30, Abb. 31). Bemerkenswerterweise kann *B. fabae*, anders als *B. cinerea*, seine Wirtspflanze ohne Zugabe von Zucker in den Inokulationstropfen normal infizieren. Dies könnte ein Vorteil bei der Infektion gegenüber *B. cinerea* sein, der ebenso als Pathogen von Ackerbohnen vorkommt. Möglicherweise stehen in den größeren *B. fabae* Sporen mehr Reservestoffe zur Keimung und frühen Entwicklung zur Verfügung. Auch die effizientere Erkennung keimungs- und infektionsstimulierender Signale könnte hier eine Rolle spielen. Schnelleres Eindringen und die effizientere Invasion von Epidermiszellen (Hutson und Mansfield 1980) könnten zusätzlich die schnellere Verfügbarkeit von Nährstoffen ermöglichen. Bisher wurde vor allem die effektivere Metabolisierung der durch *V. faba* gebildeten Phytoalexine der Weyeronsäure und deren Derivate für die aggressivere Infektion der Ackerbohne durch den Spezialisten *B. fabae* verantwortlich gemacht (Mansfield und Widdowson, 1973; Hargreaves *et al.*, 1977). In dieser Arbeit identifizierte *B. fabae* spezifische Gene, die im Genom von *B. cinerea* nicht vorkommen und während der Infektion auf Ackerbohne exprimiert sind, codieren anteilig für viele hypothetische Proteine unbekannter Funktion. Da diese nicht für sekretierte Proteine codieren, konnten keine Hinweise auf für *B. fabae* spezifische Effektorproteine erbracht werden. Daraus lässt sich schließen, dass die phänotypischen Unterschiede der beiden Spezies eher durch differenzielle Regulierung der in beiden Spezies vorhandenen Gene/Proteine verursacht werden. *B. cinerea* spezifische Gene, die im *B. fabae* Genom nicht kodiert sind, wurden in dieser Arbeit nicht thematisiert. Im Folgenden werden daher ausschließlich Gene/Proteine diskutiert, die im Genom beider Spezies vorkommen.

Alle im quantitativen Vergleich auf Ackerbohne spezifisch sekretierten *B. fabae* Proteine (u.a. 15 CAZymes, acht lytische Enzyme und zwei Serin-Proteasen) waren vergleichsweise nur sehr schwach sekretiert, was dafür spricht, dass diese kaum von besonderer Relevanz für die Infektion von *B. fabae* sind. Transkriptomanalysen während der Infektion von *V. faba*

## Diskussion

zeigten deutliche Expressionsunterschiede zwischen *B. fabae* und *B. cinerea*, z.B. für sekretierte CAZymes und Proteasen (Abb. 33). Innerhalb dieser Gruppen waren allerdings etwa gleich viele Gene zwischen den beiden Spezies über- und unterexprimiert. Verschiedene Virulenz-assoziierte Gene zeigten auf Bohne eine deutlich niedrigere Expression in *B. fabae* im Vergleich zu *B. cinerea*, was darauf hindeutet, dass *B. fabae* z.T. andere Proteine als *B. cinerea* für die Infektion seiner Wirtspflanze benötigt.

Der Vergleich der Sekretome zeigte, dass bei beiden Spezies sowohl auf Tomate, als auch auf Bohne CAZymes ca. 50% der sekretierten *Botrytis*-Proteine ausmachten. Die Anteile der funktionellen Gruppen der bei allen Bedingungen durch beide Spezies sekretierten Proteine waren ähnlich und es wurden mehr als 100 durch beide Spezies auf beiden Pflanzen sekretierte Proteine identifiziert (Abb. 34, Tab. 5). Das Fehlen der nur von *B. cinerea* auf Tomatenblättern sekretierten 17 CAZymes, acht lytischen Enzyme und sechs Serin-Proteasen könnte mitverantwortlich dafür sein, dass *B. fabae* auf Tomate keine Sekundärläsionen bildet, aber diese Annahme ist schwer zu überprüfen. In anderen Studien wurde die vom jeweiligen Wirtsgewebe abhängige differenzielle Expression und Diversität der CAZymes als Anpassung an die Vielzahl der Wirtspflanzen von *B. cinerea* interpretiert (Blanco-Ulate, 2014), aber auch dies wurde bisher noch nicht experimentell überprüft.

Die hohe Proteaseaktivität von *B. cinerea* auf Tomate ist hauptsächlich durch Aspartylproteasen bedingt, vor allem durch die auf Tomatenblättern von beiden Spezies am abundantesten sekretierte Ap8 (vgl. Kapitel 5.3). Auch der Serinprotease-Inhibitor PMSF reduzierte die Aktivität bei *B. cinerea* leicht (Abb. Anhang 12). Analoge Inhibitor-Tests mit *B. fabae* Exudaten wurden bisher noch nicht durchgeführt. *B. fabae* zeigte auf Tomate eine signifikant niedrigere Proteaseaktivität. Dies und die höhere Anzahl der cytosolischen Proteine sprechen dafür, dass *B. fabae* möglicherweise insgesamt weniger *Botrytis*-Proteine sekretiert. Quantitative Analysen könnten Aufschluss darüber geben, ob wie bei den *B. cinerea* VELVET-Mutanten auch bei *B. fabae* eine größere Menge an Pflanzenproteinen in der Sekretom-Probe gefunden wird. Allerdings war auf Ackerbohne auch die Proteaseaktivität von *B. cinerea* deutlich niedriger als auf Tomate (Abb. 35). Dies deutet darauf hin, dass die generelle Bedeutung der von *Botrytis* sekretierten Proteasen auf Bohne geringer ist. Interessanterweise besitzen die auf Ackerbohne sekretierten Proteasen von *B. fabae* ein deutlich höheres pH-Optimum als die Proteasen von *B. cinerea* (Abb. 35). Die Bedeutung der Proteasen für die Infektion von *Botrytis* ist bisher noch ungeklärt, es wäre jedoch von Interesse die *B. fabae* Proteasen zu identifizieren, die das gegenüber *B. cinerea* veränderte pH-Optimum bei pH 5,8 bedingen.

Zusammenfassend kann aus den gezeigten Daten geschlossen werden, dass bei den Interaktionen der beiden Spezies mit ihren Wirtspflanzen z.T. unterschiedliche Virulenzmechanismen angewandt werden. Auch bei einer generalistisch infizierenden Art wie

## Diskussion

*B. cinerea* hängt der Einsatz und der Erfolg unterschiedlicher Infektionsstrategien, wie z.B. die Relevanz des pH-Werts und der Aktivität der sekretierten Enzyme, von der infizierten Wirtspflanze ab. Dabei spielt vor allem auch die unterschiedliche Antwort der Pflanze zur Abwehr des Pathogens eine entscheidene Rolle (Jones und Dangl, 2006). Die Komplexität der Wirts-Parasit-Interaktionen macht es schwer die genauen Mechanismen zu identifizieren, die den Unterschied zwischen Wirtsspezifität und einem breiten Wirtsspektrum ausmachen. Die Daten dieser Arbeit liefern jedoch einige neue Hinweise darauf, was die Wirtsspezifität bei *B. fabae* beeinflussen könnte.

## 6. Material & Methoden

### 6.1 Chemikalien, Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterial

Für diese Dissertation wurden Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien und Enzyme der nachfolgenden Firmen verwendet: AHF Analysetechnik (Tübingen, DE), AMPri (Stelle, DE), AppliChem GmbH (Darmstadt, DE), Bender&Hobein (Bruchsal, DE), Biometra (Göttingen, DE), Bio-Rad (Hercules, USA), Canon (Tokio, JPN), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE), Carl Zeiss GmbH (Jena, DE), Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena, DE), Cell Signaling (Leiden, NL), Compro Scientific, Veenendaal, NL) Corning (Tewksbury, USA), Duchefa Biochemie BV (Haarlem, NL), Eppendorf AG (Hamburg, DE), Eurofins (Ebersberg, DE), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, DE), Gilson (Villiers le Bel, F), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, DE), Invitrogen GmbH (Carlsbad, CA, USA), Labnet (New Jersey, USA), Leica (Solms, DE), Liebherr (Bulle, CH), Macherey-Nagel GmbH (Düren, DE), Merck KGaA (Darmstadt, DE), Mettler-Toledo (Gießen, DE), Metrohm, Filderstadt, DE), Molecular Devices (Sunnyvale, USA), NanoDrop Technologies (Wilmington, USA), Oxoid (Basingstake, UK), New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, DE), Novo Nordisk Ferment Ltd. (Dittlingen, CH), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE), Sartorius (Göttingen, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, DE), Stratagene (La Jolla, CA, USA), Thermo Fisher Scientific (Bremen, DE), Thermo Fisher Scientific Inc./ABgene House (Epsom, UK), und VWR (Darmstadt, DE).

Die u.a. zur Kultivierung und Transformation verschiedener Organismen angesetzten Medien und Lösungen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tab. 6: Verwendete Medien und Lösungen.**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Anmerkungen</b>
<b>Anzucht und Kultivierung von <i>Botrytis</i></b>		
HA (-Agar)	1% (w/v) Malzextrakt 0,4% (w/v) Glucose 0,4% (w/v) Hefeextrakt (1,5% (w/v) Agar-Agar)	pH 5,5; autoklavieren; bei Zugabe von Antibiotika erst auf ca 50°C abkühlen lassen
HA-Selektiv-Agar	HA-Agar 35 µg/ml Hygromycin bzw. 100 µg/ml Nourseothricin	pH 5,5; autoklavieren, Antibiotika nach Abkühlen auf 60°C zugeben
Medium X	20% (w/v) Ackerbohnenblätter püriert 10% (w/v) Saccharose 3% (w/v) NaNO <sub>3</sub> 2% (w/v) Agar-Agar ad 500 ml H <sub>2</sub> O	pH 5,5; autoklavieren
<b>Phänotypische Analysen von <i>Botrytis</i> Stämmen (Inkubationsmedien)</b>		
ME Vollmedium Malzextrakt (-Agar)	Difco Malt Extract Broth Fertigmischung (1,5% (w/v) Agar-Agar)	pH 5,5; autoklavieren

## Material & Methoden

GB5 Gamborg-Minimalmedium	0,3% (w/v) GB5 Basal Salt Mixture (Duchefa) 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (X mM Glucose/Fructose je nach Verwendung modifiziert)	pH 5,5 (oder wie im Versuch angegeben); sterilfiltrieren
GB5 für Messung organischer Säuren	0,06% (w/v) GB5 Basal Salt Mixture (Duchefa) 25 mM Glucose	pH 6 (oder wie angegeben); sterilfiltrieren
Oxalat-Test Medium	4% (w/v) Pepton 4% (w/v) Glucose 1,92% (w/v) Citrat 0,5% MgSO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O	pH 3 oder pH 6; autoklavieren
GB5-Agar (Vegetative Wachstumstests)	0,3% (w/v) GB5 Basal Salt Mixture (Duchefa) 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM Glucose (50 mM Glucose bei H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 1,5% (w/v) Agar-Agar  Stressinduktion durch Zugabe von: -Osmo- und Salzstress: 0,7 M NaCl -Osmostress: 1,4 M Sorbitol -Osmotische Stabilisierung: 0,7 M Sorbitol -Zellwandstress: 100 µg/ml Calcoflour white bzw. 250 µg/ml Kongorot -Oxidativer Stress: 10-25 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pH 5,5 (oder wie angegeben); autoklavieren Calcoflour white, Kongorot und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> erst nach dem Abkühlen auf ca. 50°C zugeben
pH-Indikator-Agar	0,3% (w/v) GB5 Basal Salt Mixture (Duchefa) <u>ohne</u> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Glucose (oder anders angegeben) (alternativ: ME-Agar anstelle von GB5)  5‰ (w/v) Bromthymolblau/Bromkresolgrün 1,5% (w/v) Agar-Agar	pH 6 oder pH 7,5; autoklavieren
Sklerotien-Medium	5% (w/v) Oxoid Malt Extract Agar Fertigmischung	pH 5,5; autoklavieren
<b>Botrytis-Transformation</b>		
Glucanex-Lösung	0,2 g Glucanex-Pulver 20 ml KCl 0,6 M/NaP 0,1 M 300 µl 1 M KOH	sterilfiltrieren
KCl 0,6 M / NaP 0,1 M	500 ml KCl 0,6 M + 50 ml Na(Pi) 1M	pH 5,8
KCl 0,6 M	22,37 g KCl Mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen	autoklavieren
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	174,23 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O	pH 7,0 autoklavieren
KHPO <sub>4</sub> (100 mM)	Mischen aus KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M) und K <sub>2</sub> HOP <sub>4</sub> (1M) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 61ml, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 39ml Dann 1:10 verdünnen für 100 mM	pH 7,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	136,09 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l H <sub>2</sub> O	pH 7,0 autoklavieren
MS	10,9 g Sorbitol 209 mg MOPS Mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen	pH 6,3 (NaOH); autoklavieren
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	7,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Mit H <sub>2</sub> O auf 50 ml auffüllen	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	68,99 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen	pH 5,8 (NaOH); autoklavieren
NaP 1 M	15,8 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M 184,2 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M Mit H <sub>2</sub> O auf 200 ml auffüllen	pH 5,8 (NaOH); autoklavieren
PEG 60%	1,2 g PEG6000 800 µl MS Mit H <sub>2</sub> O auf 2 ml auffüllen	Frisch ansetzen, bei 60°C lösen

## Material & Methoden

SH-Agar	205,4 g Saccharose 5 ml 1 M Tris-HCl 0,115 g (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6 - 0,8% (w/v) Bacto-Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O	pH 6,5 mit HCl einstellen, autoklavieren
TMS	91 g Sorbitol 1045 mg MOPS, ad 500 ml l H <sub>2</sub> O	pH 6,3 (NaOH); autoklavieren
TMSC	18.2 g Sorbitol 209 mg MOPS 588 mg CaCl <sub>2</sub> , ad 100 ml l H <sub>2</sub> O	pH 6,3(NaOH); autoklavieren
Tris-EDTA mit CaCl <sub>2</sub>	10 mM Tris 1 mM EDTA 40 mM CaCl <sub>2</sub>	pH 6,3(NaOH); autoklavieren

### Proteinextraktion aus *Botrytis*-Exudaten

SDS-Puffer	5% β-Mercaptoethanol 100 mM Tris-HCl pH 8 30% Saccharose 2% SDS	
TE-Puffer für Proteinextraktion	2% β-Mercaptoethanol 50 mM Tris-HCl pH8 50 mM EDTA 1mM PMSF 10 µg/ml 'Protease Inhibitor Cocktail for Fungi' (Sigma)	
Solubilization solution	9 M Urea 2 M Thiourea 20 mM DTT 4% CHAPS 0,5% Triton®-X100	

### Anzucht, Kultivierung und Transformation von *E. coli*

LB-(Selektiv-) Agar	35 g LB-Agar High Salt (Duchefa) 5 g Agar-Agar ad 1 l H <sub>2</sub> O (100 µg/ml Ampicillin) (50 µg/ml Kanamycin)	Autoklavieren, vor Zugabe des Antibiotikums auf ca. 50°C abkühlen lassen
LB-Medium	25 g LB Broth High Salt (Duchefa) ad 1 l H <sub>2</sub> O	Autoklavieren
ΨB-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Pepton aus Casein 0,4% (w/v) MgSO <sub>4</sub> 10 mM KCl	pH 7,6 (KOH); autoklavieren

### Anzucht, Kultivierung und Transformation von *S. cerevisiae*

PLATE-Lösung	40% PEG3350 0.1 M Lithiumacetat x 2 H <sub>2</sub> O 10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA ad 100 ml H <sub>2</sub> O	Autoklavieren
SC (-Agar)	2% Glucose/ Galactose 0,69% (w/v) Yeast Nitrogen Base (wo aa) 0,14% (w/v) Drop-out Mix 0,01% (w/v) Leucin, Tryptophan, Uracil 0,005% (w/v) Histidin (2,5% (w/v) Agar-Agar) (+ 0,5 - 10 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol)	Autoklavieren



## Material & Methoden

SD (-Agar)	Siehe SC (-Agar) + 40 mg/l Adenin	Autoklavieren
STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose 5% (v/v) Triton 100 50 mM Tris-HCl, 50 mM Na-EDTA	pH 8,0; autoklavieren
YPD (-Agar)	2% (w/v) Glucose 1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Pepton (aus Casein) (2% (w/v) Agar)	Autoklavieren

### Antibiotika

Ampicillin	Stocklösung 100 mg/ml Ampicillin in EtOH Endkonzentration im Medium 100 µg/ml	Lagerung bei -20 °C
Kanamycin	Stocklösung 50 mg/ml Kanamycin in H <sub>2</sub> O Endkonzentration im Medium 50 µg/ml	Lagerung bei -20 °C
Hygromycin	Stocklösung 100 mg/ml Hygromycin in H <sub>2</sub> O	Lagerung bei -20 °C
Nourseothricin	Stocklösung 100 mg/ml Nourseothricin in H <sub>2</sub> O	Lagerung bei -20 °C

### Farbstoffe

Bromkresolgrün	Stocklösung 10 mg/ml in Ethanol (p.a.)	Lagerung bei -20 °C
Bromthymolblau	Stocklösung 10 mg/ml in Ethanol (p.a.)	Lagerung bei -20 °C
Calcofluor white Stocklösung	3,5 mg/ml Calcofluor White 100 µl/ml Triton X-100 in 100 mM Tris-HCl pH 9	pH 9,0, UV geschützt Lagerung bei -20 °C
Kongorot	Stocklösung 10 mg/ml in DMSO	
Trypan-Blau (Lactophenol-Blau)	1 Vol Milchsäure 1 Vol H <sub>2</sub> O 1 Vol Phenol 1 Vol Glycerin 0,25% Trypanblau	

### SDS-PAGE

10x SDS-Laufpuffer	1% SDS 0,25 M TRIS 1,92 M Glycin	
5x Lämmli Ladepuffer	5% SDS 0.156 M TRIS-HCl pH 6.8 25% Glycerol 4.37 M β-Mercaptoethanol 0,125 mg/ml Bromphenolblau	
Sammelgel (3%)	1,1 ml 30% (37,5:1) Polyacrylamid 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 6,1 ml H <sub>2</sub> O 0,1 ml SDS (10%) 0,05 ml APS (10%) 0,01 ml TEMED	
Trenngel (12%)	8 ml 30% (37,5:1) Polyacrylamid 5 ml 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 6,8 ml H <sub>2</sub> O 0,2 ml SDS (10%) 0,1 ml APS (10%) 0,01 ml TEMED	

### Western Blot und Phosphorylierungsstudie

Blocking-Lösung	3% (w/v) BSA in TBST (mit 0,05% Tween20)	
-----------------	---	--

## Material & Methoden

TBS (10x)	20 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl	
TBST	0,1% Tween20 in 1x TBS	Tween20 frisch zugeben
Transferpuffer (1x)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol 1% SDS	

### Sonstige Medien und Lösungen

Apfelwachs Stocklösung	2 mg/ml Apfelschalenwachs Hexan (100 % p.a.)	
Apfelwachs Arbeitslösung	8,75 ml der Stocklösung mit Hexan auf 100 ml auffüllen	
Biotin-Stocklösung	0,1 mg/ml Biotin	Lagerung bei -20 °C
CTAB-Puffer	4,7% (w/v) NaCl 2,5% (w/v) Sorbitol 1% (w/v) N-Laurylsarcosin 1% (w/v) Na-EDTA 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 0,8% (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	pH 8,0; dann Zugabe von CTAB; Lagerung bei 4 °C
DAB-Färbelösung	1 mg/ml Diaminobenzidin	Erst bei pH 1,5 lösen, dann auf pH 3,5 einstellen
DNA Loading-Dye 6x	60% (v/v) Glycerol 0,1% (w/v) Bromphenolbau 60mM EDTA	Lagerung bei 4 °C
Ethidiumbromid-Färbepad	0,5 % (w/v) in H <sub>2</sub> O	
MOPS-Laufpuffer (50x)	4,19% (w/v) MOPS 0,68% (w/v) Na-Acetat 0,29% (w/v) EDTA	pH 7, autoklavieren; lichtgeschützte Lagerung
Natrium-Citrat-Puffer (50 mM)	50 mM Citrat 1x H <sub>2</sub> O 50 mM Na <sub>3</sub> Citrat 2x H <sub>2</sub> O	Sterilfiltrieren
<sup>15</sup> N-Hoagland für Pflanzen	Hoagland-Nährlösung 0,7 g/l <sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (98% <sup>15</sup> N; Compro Scientific)	pH 5,7
<sup>15</sup> N-Vogel's Medium	2 ml Vogel's Salzlösung 25 mM Glucose 2 g <sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (98% <sup>15</sup> N; Compro Scientific) ad 100 ml H <sub>2</sub> O	pH 5,7, kein Einstellen nötig
<sup>15</sup> N-Vogel's Medium Salzlösung (50x)	1,25 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Anhydrat 0,65 g Na <sub>3</sub> Citrat 2x H <sub>2</sub> O 0,5 g <sup>15</sup> N-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (98% <sup>15</sup> N; Compro Scientific) 0,05 g MgSO <sub>4</sub> 7x H <sub>2</sub> O 0,025 g CaCl <sub>2</sub> 2x H <sub>2</sub> O 0,025 ml Spurenelemente 0,0125 ml Biotin-Stocklösung ad 5 ml H <sub>2</sub> O	
RNA Loading Dye	7,5 ml Formamid (deionisiert) 2,4 ml 37% Formaldehyd (p.A., 37%) 1,5 ml 10x Laufpuffer 1 ml H <sub>2</sub> O 1 ml Glycerin 0,8 ml 10% Bromphenolblau	Lagerung bei -20 °C
RNAse A	10 mg/ml in TE-Puffer	Lagerung bei -20 °C

Spurenelemente	0,5 g Citrat 1x H <sub>2</sub> O 0,5 g ZnSO <sub>4</sub> 7x H <sub>2</sub> O 0,06 g Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 6x H <sub>2</sub> O 0,025 g CuSO <sub>4</sub> 5x H <sub>2</sub> O 0,005 g MnSO <sub>4</sub> 1x H <sub>2</sub> O 0,005 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Anhydrat 0,005 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2x H <sub>2</sub> O ad 10 ml H <sub>2</sub> O	
TAE-Laufpuffer (50x)	24,2% (w/v) Tris 5,71% (w/v) Essigsäure 50 mM EDTA	pH 8,0
Taq-Y-Puffer	40 mM Tris 0,02% (v/v) Tween 20 4 mM MgCl <sub>2</sub>	pH 8,8 (HCl) einstellen, Lagerung bei -20 °C
TE-Puffer (10x)	1,21 g Tris 0,37 g EDTA ad 100 ml H <sub>2</sub> O	pH 7,5, sterilfiltrieren

## 6.2 Verwendete Mikroorganismen

### 6.2.1 *Escherichia coli*

Es wurde mit verschiedenen *E. coli* Stämmen gearbeitet, welche in Tabelle 7 aufgelistet sind (vgl. Liste verwendete Plasmide 6.4.2).

Tab. 7: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Für Transformationen verwendete <i>E. coli</i> Stämme		
Name	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac1q</i> ZΔM15 Tn10(tetr)]c	Stratagene
DH5-α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen
ONE shot	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	ThermoFisher Scientific

### Transformanten zur Erstellung der Y2H-Konstrukte

Name	<i>E. coli</i> Stamm	Herkunft
pDHB1_Msb2-CT	XL1-Blue, Kanamycin resistent	Diese Arbeit
pPR3N_Msb2-CT	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
pDHB1_Sho1	XL1-Blue, Kanamycin resistent	Diese Arbeit
pPR3N_Sho1	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit

### In dieser Arbeit zur Vermehrung von Plasmiden erstellte Transformanten

Name des Stamms	<i>E. coli</i> Stamm	Herkunft der Plasmide
<i>bic5</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Müller, 2012
<i>bic8</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>plc1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>cel1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>af1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>lpl1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>cda1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>gis1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>gis2</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>gis3</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>gic1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit
<i>gic2</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistent	Diese Arbeit

## Material & Methoden

<i>gim1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistant	Diese Arbeit
<i>arp1</i> -KO	XL1-Blue, Ampicillin resistant	Diese Arbeit
<i>vel2</i> -KO	ONE shot, Ampicillin resistant	Diese Arbeit
<i>sho1</i> -KO-d	XL1-Blue, Ampicillin resistant	Diese Arbeit
<i>sho1</i> -KO-NatR	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Peter, 2009
Sho1-C	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Nixdorf, 2013
Sho1-CIL	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Diese Arbeit
VEL1-GFP	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
VEL2-GFP	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
LAE1-GFP	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
VEL1-COM1	DH5- $\alpha$ , Ampicillin resistant	Schumacher <i>et al.</i> , 2012

### 6.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die für die verschiedenen Experimente verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tab. 8: Verwendete Hefestämme.**

Hefestämme für Yeast two-hybrid (Y2H) Analysen		
Name	Genotyp	Herkunft
NMY51	<i>MATa his3delta200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 ura3::(lexAop)8-lacZ (lexAop)8-ADE2 GAL4</i>	Dualsystems Biotech DUALhybrid, DUALmembrane und DUALhunter Screening Systems
Y2H-Transformanten für Reporter-Gen-Analyse der Protein-Interaktionen		
Name	Hefestamm	Herkunft
pDHB1_bmp1 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pBT3C_bmp1 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pDHB1_ste11 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pBT3C_ste11 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pDHB1_ste7 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pBT3C_ste7 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pDHB1_ste50 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pBT3C_ste50 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	Müller, 2012
pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_leer	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_leer	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_pOst1-Nubl	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_bmp1 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_bmp1 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_bmp1 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_bmp1 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_ste7 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_ste7 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_ste7 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_ste7 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_ste11 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_ste11 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_ste11 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_ste11 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_ste50 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_ste50 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_ste50 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit
pBT3C_ste50 + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_bmp1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_ste7	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_ste11	NMY51	diese Arbeit

## Material & Methoden

pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_ste50	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Msb2-CT + pPR3N_Sho1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_bmp1	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_ste7	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_ste11	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_ste50	NMY51	diese Arbeit
pDHB1_Sho1 + pPR3N_Msb2-CT	NMY51	diese Arbeit

### Für Yeast Recombinational Cloning (YRC) verwendeter Hefestamm

Name	Genotyp	Herkunft
INVSc1	MATa <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i> /Mata <i>his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen

### Hefestämmen mit über YRC erstellten Konstrukten

Name	Hefestamm	Herkunft
<i>bic5</i> -KO	INVSc1	Müller, 2012
<i>bic8</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>plc1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>cel1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>af1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>lpl1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>cda1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>gis1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>gis2</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>gis3</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>gic1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>gic2</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>gim1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>arp1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>sho1</i> -KO	INVSc1	diese Arbeit
<i>sho1</i> -CIL	INVSc1	diese Arbeit

### 6.2.3 *B. cinerea* und *B. fabae*

Es wurde mit den in Tab. 9 beschriebenen *B. cinerea* und *B. fabae* Stämmen gearbeitet.

**Tab. 9: Verwendete *Botrytis* Stämme.**

<i>B. cinerea</i> Stamm	Genotyp	Referenz
WT:B05.10	Wildtyp-Isolat von Trauben	Quidde <i>et al.</i> , 1998
WT::VEL1-GFP	B05.10, <i>PoliC::vel1-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
WT::VEL2-GFP	B05.10, <i>PoliC::vel2-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
WT::LAE1-GFP	B05.10, <i>PoliC::lae1-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
<i>oahA</i>	B05.10, $\Delta$ <i>bcoahA::hph</i> ; homokaryon	Han <i>et al.</i> , 2007
<i>vel1</i>	B05.10, $\Delta$ <i>bcvel1::hph</i> ; homokaryon	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
<i>lae1</i>	B05.10, $\Delta$ <i>bclae1::nat1</i> ; homokaryon; homokaryon	Schumacher <i>et al.</i> , 2015
<i>vel1::VEL1*</i> -GFP	B05.10, $\Delta$ <i>bcvel1::hph::PoliC::vel1*-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; homokaryon	J. Schumacher
<i>vel1*</i>	B05.10, <i>vel1*</i> mutation C→T (1615 bp); $\Delta$ <i>bcsho1::hph</i> (insertion); homokaryon	Peter, 2009
<i>vel1*-d</i>	B05.10, <i>vel1*</i> mutation C→T (1615 bp); $\Delta$ <i>bcsho1::hph</i> (deletion); homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel1*::Sho1</i>	B05.10, $\Delta$ <i>bcsho1::hph::sho1::nat1 in loco</i> ; <i>vel1*</i> mutation; homokaryon	Diese Arbeit
WT::Sho1	B05.10, <i>sho1::nat1 in loco</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel1*::VEL1</i> -GFP	B05.10, <i>vel1*::PoliC::vel1-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; $\Delta$ <i>bcsho1::hph</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel1*::VEL2</i> -GFP	B05.10, <i>vel1*::PoliC::vel2-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; $\Delta$ <i>bcsho1::hph</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel1*::LAE1</i> -GFP	B05.10, <i>vel1*::PoliC::lae1-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; $\Delta$ <i>bcsho1::hph</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel1*::VEL1</i>	B05.10, <i>vel1*::vel1::nat1 in loco</i> ; $\Delta$ <i>bcsho1::hph</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel2</i>	B05.10, $\Delta$ <i>bcvel2::hph</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel2::VEL1</i> -GFP	B05.10, $\Delta$ <i>bcvel2::hph::PoliC::vel1-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel2::VEL2</i> -GFP	B05.10, $\Delta$ <i>bcvel2::hph::PoliC::vel2-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; homokaryon	Diese Arbeit

## Material & Methoden

<i>vel2::LAE1-GFP</i>	B05.10, $\Delta bcvel2::hph::PoliC::lae1-gfp::nat1$ in <i>bcniiA</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>vel3</i>	B05.10, $\Delta bcvel3::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>sho1</i>	B05.10, $\Delta bcsho1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>sho1-C</i>	B05.10, $\Delta bcsho1::hph::sho1::nat1$ in <i>bcniiA</i> ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>msb2</i>	B05.10, $\Delta bcmsb2::hph$ ; homokaryon	Leroch <i>et al.</i> , 2015
<i>msb2/sho1</i>	B05.10, $\Delta bcmsb2::hph + \Delta bcsho1::nat1$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>bic5</i>	B05.10, $\Delta bcbic5::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>bic8</i>	B05.10, $\Delta bcbic8::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>plc1</i>	B05.10, $\Delta bcplc1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>cel1</i>	B05.10, $\Delta bccel1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>af1</i>	B05.10, $\Delta bcacf1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>lpl1</i>	B05.10, $\Delta bcplp1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>cda1</i>	B05.10, $\Delta bccda1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>gis1</i>	B05.10, $\Delta bcgis1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>gis2</i>	B05.10, $\Delta bcgis2::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>gis3</i>	B05.10, $\Delta bcgis3::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>gic1</i>	B05.10, $\Delta bcgic1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>gic2</i>	B05.10, $\Delta bcgic2::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>gim1</i>	B05.10, $\Delta bcgim1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit
<i>arp1</i>	B05.10, $\Delta bcarp1::hph$ ; homokaryon	Diese Arbeit

<b>B. fabae Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>
11002	Wildtyp Isolat von Ackerbohnen	Frankreich
D12_B_B09	Wildtyp Isolat von Ackerbohnen	Deutschland
G12_?_B02	Wildtyp Isolat von Ackerbohnen	Griechenland

## 6.3 Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen

### 6.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Zur Selektion transformierter *E. coli*-Zellen wurden 10 bis 80 µl des Transformationsansatzes auf LB-Selektivagar (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Vermehrung wurden Zellen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 225 rpm auglukof dem Schüttler bei 37°C inkubiert.

### 6.3.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht erfolgte durch Ausstreichen einer Einzelkolonie oder das Ausplattieren von 10 µl einer Dauerkultur. Hefestämme wurden auf YPD-Agar oder mit den entsprechenden Aminosäuren versetzten SC-Selektivagar bei 28°C kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden jeweils 5 ml entsprechendes SC-Selektivmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 28°C bei 225 rpm über Nacht geschüttelt.

### 6.3.3 Kultivierung von Pflanzen für Standard-Infektionstests

Pflanzen wurden in Pflanztöpfen mit 50% ED73 Pflanzenerde, 25% Bims und 25% Sand bei 16 h Licht in 60% relativer Luftfeuchte kultiviert. Für Infektionstests wurden 4-5 Wochen alte *Solanum lycopersicum* Blätter (Sorte „Moneymaker“) verwendet. *Vicia faba* Blätter (Sorte „Fuego“) wurden in einem Alter von drei Wochen für Infektionstests benutzt oder nach fünf

Wochen für die Herstellung von Medium X geerntet (vgl. Tab. 6). Von *Phaseolus vulgaris* (Sorte „Elite“) wurden Primärblätter (2-3 Wochen alt) für die Experimente verwendet.

### 6.3.4 Kultivierung von *Botrytis* Stämmen

*B. cinerea* wurde auf HA-Agar bei 20 °C in künstlichem Dauerlicht kultiviert, *B. fabae*-Stämme auf Medium X. Nach 10-12 Tagen wurde sporulierendes Myzel mit ca. 10 ml H<sub>2</sub>O bedeckt und mithilfe eines Drigalskispatels abgelöst. Die Sporensuspension wurde mittels eines Glaswollfilters von Myzel- und Agarrückständen getrennt. Das Filtrat wurde anschließend 3-4x gewaschen (bei 3.000 rpm 3 min zentrifugiert, die Flüssigkeit verworfen und die Sporen in frischem H<sub>2</sub>O resuspendiert). Die Sporenkonzentration wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

## 6.4 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden wie PCR, Restriktionsverdau, Ligation oder Gelelektrophorese wurden nach Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen wurde das Reaktionskit NucleoSpin® PCR and Gel Clean up (Macherey-Nagel) verwendet.

### 6.4.1 Verwendete Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins synthetisiert (Tab. 10).

**Tab. 10: Name, Sequenz und Verwendungszweck der eingesetzten Primer.**

KO-Mutagenese, Verifizierung von Transformanten, WT-Kern Nachweis	
Name	Sequenz
backbone_fw	GGGCCCGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC
backbone_rev	CCGCGGCGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTAC
pTRPC-F	ACTAGTGATATTGAAGGAGCATTTCCTGGGCTTGCC
HPH-R	CTACTCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTG
Split-Hyg_fw	CGTCTGTGCGAGAAGTTTCTG
Split-Hyg_rev	AACATCGCCTCGCTCCAGTC
Hyg_screen_rev	ACATATCCACGCCCTCCTAC
Hyg_screen_fw	CTGTCGGGCGTACACAAATC
opt-Hyg_screen	CTGGACCGATGGCTGTGTTG
<i>sho1</i> -KO_5F	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAACCATTTCGCTCGCTACC
<i>sho1</i> -KO_5R	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCCGTCGCAAATAAGGGCATTCCG
<i>sho1</i> -KO_3F	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGGCACACCTTCGTTGATAG
<i>sho1</i> -KO_3R	GATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGGCCCTTGCTCCTCCACA
<i>sho1</i> -KOF	CACCAGCCAACCTATCCTAT
<i>sho1</i> -RT-fw	CAAGTTCCTCGGTCAACTC
<i>sho1</i> -RT-rev	GCAGTCGACATTCTCTTC
<i>sho1</i> _Xbal	CTCTAGACGGATTATAAAGGTCCGAGGACAGC
<i>sho1</i> _HindIII	GTTAAGCTTGGCCTTCGCTCGGTATGGAT
<i>oliC</i> -F	GACGTATTTAGGTGCTAGGG
<i>bic5</i> _5F	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAACGACGCCGCGGGGTGTGGTGATTGGTATAG

## Material & Methoden

<i>bic5_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCAATATCACTAGTTATTCTTGCACGGCCACGTTT
<i>bic5_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGCTAACCGTCCCAAGTATTGC
<i>bic5_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGGCCCCCTTGGGTCCCTCTGTTATG
<i>bic5_KOF</i>	GCCTTGCTGTGCGAAATCTG
<i>bic5_wtF</i>	CTGTACAAGGCCATTACGGCCATGGATCAACTTCGTACCGTCTCC
<i>bic8_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTGAGGAAGCTGGAGGTTTG
<i>bic8_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCAATATCGGAGAGCGGTTTTGAGTCAGG
<i>bic8_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGTTATGTGTCCGCAACGTGAG
<i>bic8_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCGGATGTGGAAGGGAAATGAG
<i>bic8_KOF</i>	CGGCCAATATGCCCAATTAG
<i>bic8_wtF</i>	GCTAGCAAGGCCATTACGGCCATGTCTTCCAGTGCTAAGAACTG
<i>plc1_F1F</i>	GATGGGCCCTAGTGTGCGGAGTAAGGTG
<i>plc1_F1R</i>	GCGTCTAGAGGAGAGGTCGTTGGGATGAAG
<i>plc1_F2F</i>	GGAAATCGGTTGCCAGGTTG
<i>plc1_F2R</i>	GCAGGTACCAATCTGCGGATCAACTGC
<i>plc1-multi_KOR</i>	CATAGAGAAAGGGCTGATGG
<i>plc1_wtF</i>	CGCTGGTGTCTCGGTATC
<i>plc1_wtR</i>	GCGAGCGTCCAGAAGTATG
<i>cel1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGATCGGGTTTCCGTAGAAATCC
<i>cel1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCAAACCCATTCTGGCCACTTAG
<i>cel1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGAATGTTACGCGACCTGAG
<i>cel1_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGCAATAGTGGTTCGATAATGG
<i>cel1_KOF</i>	TCGGTTCGTAGGTAGGCTTAG
<i>cel1_KOR</i>	TTTCAGCCCTTGATCCACAC
<i>cel1_wtF</i>	TGATGACGGAAGTACTGAGACTG
<i>cel1_wtR</i>	AACAATAGCGGCGACAAC
<i>af1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACACAAGAGGCCGAAATCGAG
<i>af1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCCGATCCAGATGCCAACGAAAC
<i>af1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAAACCACATACGGTCTGCTGCGGATAG
<i>af1_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCAGTTCAGGAGGCTCAGCAAG
<i>af1_KOF</i>	GCTTGTGCGTTGGGAGAACG
<i>af1_wtF</i>	TCGGGCTCTTCAAACTGG
<i>af1_wtR</i>	TTAGCCTTTCGGCGAATGG
<i>lpl1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCGACGCCGTAATCTGTACAC
<i>lpl1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCGGAGCTACTGCTGGATATG
<i>lpl1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGTCCGCTCGAAGTAAATCC
<i>lpl1_3R</i>	GATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGGCCCTAACAGAGTCCGGCTCAAC
<i>lpl1_KOF</i>	TCTCGTTCTCGTTCCCATTC
<i>lpl1_KOR</i>	ACTAACAGAGTCCGGCTCAAC
<i>lpl1_wtF</i>	GATCGCCGCATTCGATAACC
<i>lpl1_wtR</i>	GGCCGAGAGTTCAAACCAAG
<i>cda1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCTATCCAGGACCGAGAGCGACAACCTTC
<i>cda1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCATGGTCTGATATGCCGGAGTAGGGGTG
<i>cda1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGGTGTTTCCCATAGCCCAAACG
<i>cda1_3R</i>	GATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGGCCACCGGGACACCACAGATATAC
<i>cda1_KOF</i>	TGGACGAACGATGAATGG
<i>cda1_wtF</i>	ACTGCGGAAGTACCCAAGAC
<i>cda1_wtR</i>	TAACGCCCTTCCATCCTCTG
<i>gis1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCCAAGAACGGATAAACG
<i>gis1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTACATCGCAAGGCGATTTAG
<i>gis1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGTGCCACACTTCAGTCGTATG
<i>gis1_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGAAAGAGGCAACGATCAGAC
<i>gis1_KOF</i>	TCGCTAATCCTTACCTACC
<i>gis1_KOR</i>	GCCTTCTCCATCCCTGTAG
<i>gis1_wtF</i>	GGCACAACATTGCTTACG



## Material & Methoden

<i>gis1_wtR</i>	AGCGGCTTGAGTAGAAAC
<i>gis2_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGCTCTGACGAGCACCGATATTC
<i>gis2_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCGACTCAACGCCGTTGATTCAC
<i>gis2_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGCTTGGCTGTGGTACCGGAAATG
<i>gis2_3R</i>	GATAACAATTTACACAGGAAACAGCGGGCCCTCGGTAGCGCTTGGTATACTGG
<i>gis2_KOF</i>	AGCATGACGCTCAATCAG
<i>gis2_wtF</i>	GGTCTCACCAAGCGACAATC
<i>gis2_wtR</i>	TTGTGTAGGCTGGAGGACTG
<i>gis3_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCTTTCCTTCACCCACATC
<i>gis3_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCGAGACGCTGTCTAAGAG
<i>gis3_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGGAAGAGGCGAGAACAAAG
<i>gis3_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGTGGCTAGTAGGGCATAAC
<i>gis3_KOF</i>	CCCTCTCAGATACCATACAC
<i>gis3_KOR</i>	AAAGGGACAGGCCACATTCG
<i>gis3_wtF</i>	GCTGCCAACACTACAATGTC
<i>gis3_wtR</i>	GTGCAATTTGCAGCAGTTCC
<i>gic1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACCCGTGAACATCCAGACCATTTCG
<i>gic1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCTGTGGCTTATGAACGCACCTCTCG
<i>gic1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGTGGGTACGGCGATCAAC
<i>gic1_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTGCACCGCATCAGTAGAAGG
<i>gic1-KOF</i>	ACCTGACTGACCTACCAATC
<i>gic1_wtF</i>	AGGGAAAGGGCATGTCATGG
<i>gic1_wtR</i>	TGTAGAAGCGGAGACAAGGG
<i>gic2_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACCTTTACAAACTGCCTCGGTACG
<i>gic2_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCGAATGTGGTTGTGAGGGTATGC
<i>gic2_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGGAGCATTGGCGTCTGTGAG
<i>gic2_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCACTACTTGCCACCCATCC
<i>gic2_KOF</i>	GACCCTTTGCATGGTCTTTC
<i>gic2_KO-R</i>	CCGCTCATACCACCTTTGAC
<i>gic2_wtF</i>	TACCACACTCTCAGTGCCTTTC
<i>gic2_wtR</i>	CCGCTTCAATCAACGTCTATC
<i>gim1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAAACCGTGCCTCCTAGTAAG
<i>gim1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCAATATCCAACACGAGCTCATGTTCC
<i>gim1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATAGAAGCGGAGGATACAGG
<i>gim1_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGCGACGCATCTAAGATAAGG
<i>gim1_KOF</i>	CACTCCGCCACCAAGCAAAC
<i>gim1_KOR</i>	GTAGCACTGGCGAACAAGGC
<i>gim1_wtF</i>	GAATGCCCAAGCATCAACTC
<i>gim1_wtR</i>	ATCTCTTGAAGTGCCCTTCC
<i>arp1_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACCTCACCCGACTGAGTGAAATG
<i>arp1_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCACAGCGTACAAGACTCCGTAACC
<i>arp1_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGGCATGGTGGCATAAG
<i>arp1_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGCGTGCAGCTATCTGTATGG
<i>arp1_KOF</i>	CCCACCTTCCAATCACAAAC
<i>arp1_KOR</i>	AAGCACGCAAATGGGAATCG
<i>arp1_wtF</i>	CCGCCTCATTACAATCAGAC
<i>arp1_wtR</i>	CACTTCCAGCATCATCATCC
<i>cls-N_5F</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAGCGGAAAGGTCTTGGATGAAC
<i>cls-N_5R</i>	GCCAAGCCCAAAAAATGCTCCTTCACGCGTGATGTGTAGTCTTGAG
<i>cls-N_3F</i>	CACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGACGGTGATGCTATCGGGTGATGG
<i>cls-N_3R</i>	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACGGGTTGTGGTGACGGTGAAGTG
<i>cls-N_KOF</i>	GTCGGCAAGACCTATCAATG
<i>cls-N_wtF</i>	GGCAATGCGTGGAATAC
<i>cls-N_wtR</i>	AAACCGAGGATAGGGAAG
<i>vel2_5F</i>	CTCGGTACGTAGAGGGTAGGGTGTCTGTGG

## Material & Methoden

<i>vel2_5R</i>	TACATACGGAGACGGTATGGGTATGTGAGAGT
<i>vel2_hphF</i>	ACCGTCTCCGTATGTAGATAAGATGTATGATT
<i>vel2_hphR</i>	GGCTCACGCGGAGGATGATATTGAAGGAGCAT
<i>vel2_3F</i>	ATCCTCCGCGTGAGCCGAGATCAGAAGAGAAA
<i>vel2_3R</i>	TGCATGCCGTTCTCTCTCTCCCTGTAGCCC
<i>vel2_KOR</i>	ACGCCCCGCGAGTGTTATCAG
<i>vel2_wtF</i>	GAAGTTTCCTGGTGTGGTAG
<hr/>	
<i>vel3_5F</i>	CCCTTGCCCTGGCACTTTATC
<i>vel3_5R</i>	TTCACTCAACGCACCCTTGATACAGTC AGCATATGTTGGTGGCCGAGGAG
<i>vel3_3F</i>	ATCCGGCCCGAATCGGAATGCGGCTC CACAGGTTGAAAGCGGGAGTTAG
<i>vel3_3R</i>	CGTTGATGTGGAGAGTAG
<i>PoliC_for</i>	CTGTGGAGCCGCATTCCGATTC
<i>TtrpC_rev</i>	GCTGACTGTATCAAGGGTGC GTTGAG
<i>hph_split1</i>	AACTCACCGCAACTTCTGTC
<i>hph_split2</i>	GCTGTAATTCGGCCATTGTC
<i>vel3_KOF</i>	GCACCTTCAACATCCAATTCC
<i>vel3_wtR</i>	GGAGCCCTTTGAGTACAATG

### **sho1 Komplementation in locus**

<i>sho1_CiL_fw</i>	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCCGCGGCTCACGACGCAAGATGAACC
<i>sho1_CiL_rev</i>	CCTAATCATACATCTTATCTACATACGCTAGGTGTGCTGTTGCATATTGG
HPH-F	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC
Tgluc-F2	TAGCGTATGTAGATAAGATGTATG
<i>sho1_CiL_3F</i>	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACGCACACCTTCGTTGATAG
<i>sho1-KO-R</i>	ACTTGGTCCCTCCATTCAAC
<i>split-nat_rev</i>	GGCAGGGCATGCTCATGTAG
<i>hph-TAG</i>	TCGGATCCCTATTCTTTGCCCTCGG

### **Kontrolle der *niiA* Deletion durch korrekte Integration von Konstrukten**

KO_NA_Locus	GGTATGGCAGCATGAGTG
NA_WT_screen	ACTCAGCATGGCATAACC

### **qRT-PCR Transkriptom Analyse**

<i>Bcact_RT_fw</i>	TCTGTCTTGGGTCTTGAGAG
<i>Bcact_RT_rev</i>	GGTGCAAGAGCAGTGATTC
<i>BcEF_RT_fw</i>	ATGCTATCGACCCTCCTTCC
<i>BcEF_RT_rev</i>	GTTGAAACCGACGTTGTCAC
<i>acp1_RT_fw</i>	AGTGCTTCCAACAAGGGAACAG
<i>acp1_RT_rev</i>	TTTGCGAGTACAATGCCGAGTG
<i>pacC_RT_fw</i>	ACCGCTACTATTAGCTCTCC
<i>pacC_RT_rev</i>	CTCAATCCATGCCTCTTCAG
<i>ap8_RT_fw</i>	TCCGCCTCTGGAATCGTTGAC
<i>ap8_RT_rev</i>	TACTGGGCAGTTGGGACCAAG
<i>oahA_RT_fw</i>	CCACCAAGGAAGCACAAG
<i>oahA_RT_rev</i>	ACCAGCCGAGTATCAAC
<i>pg1_RT_fw</i>	CTGCCAACGGTGTCCGTATC
<i>pg1_RT_rev</i>	GAACGACAACACCGTAGGATG

### **Yeast two-hybrid Analyse**

pPR3N_ <i>msb2</i> _fw	GCTGCCAAGGCCATTACGGCCAGATATAAGAAGCGTAAGCTTAGCC
pPR3N_ <i>msb2</i> _rev	GAAATATTGGCCGCGGCGGCCCTCAATTCCATCCCAATG
pDHB1_ <i>msb2</i> _rev	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCCATTCCATCCCAATGAATTCTCGGCCATC
pPR3N_ <i>sho1</i> _fw	GCTAACAAGGCCATTACGGCCATGAACCAATCGGATTATAAAGGTCGG
pPR3N_ <i>sho1</i> _rev	GGACCACTGGCCGCGGCGGCCCTTATAACAAAATTAGGTAATTCCG
pDHB1_ <i>sho1</i> _rev	GCCTGATTGGCCGAGGCGGCCCTAACAAAATTAGGTAATTCCG
<i>cls-N_fw</i>	GTTAACAAGGCCATTACGGCCATGTTCCAGAATACCCTCGCTCTC

## Material & Methoden

<i>cls-N_rev</i>	AATAAATTGGCCGAGGCGGCCTTATGGAATAGCTTCGTACGAGCCGCTGCCAG
<i>rab1_fw</i>	GCGAACAAGGCCATTACGGCCATGAATCCCGAATACGATTACCTC
<i>rab1_rev</i>	ATATTATTGGCCGAGGCGGCCTAACAGCATCCACCAGCAGAC
CYC-screen	TACATGCGTACACGCGTCTG
LexA-screen	ATACCTGTCTGGCTGATGTG
Cyc1P	TGGATCAAGCCCACGCGTAG
NubG_F	GGTGGTCCATACCCATACG

### 6.4.2 Verwendete Plasmide

Die während dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tab. 11: Verwendete Plasmide.**

Yeast two-hybrid Plasmide		
Name	Anmerkung	Herkunft
pBT3C	Yeast two-hybrid Bait Vektor	Yeast two-hybrid Kits
pDHB1	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit Membran-Anker	DUALhybrid, DUALmembrane und DUALhunter
pPR3N	Yeast two-hybrid Prey Vektor	(Dualsystems Biotech)
pOst1-Nubl	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit immer interagierendem Insert	
pDHB1_bmp1	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>bmp1</i> -Insert	
pBT3C_bmp1	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>bmp1</i> -Insert	
pPR3N_bmp1	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit <i>bmp1</i> -Insert	
pDHB1_ste7	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>ste7</i> -Insert	
pBT3C_ste7	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>ste7</i> -Insert	
pPR3N_ste7	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit <i>ste7</i> -Insert	
pDHB1_ste11	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>ste11</i> -Insert	Müller, 2012
pBT3C_ste11	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>ste11</i> -Insert	
pPR3N_ste11	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit <i>ste11</i> -Insert	
pDHB1_ste50	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>ste50</i> -Insert	
pBT3C_ste50	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>ste50</i> -Insert	
pPR3N_ste50	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit <i>ste50</i> -Insert	
pDHB1_Msb2-CT	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>msb2</i> -Insert	
pPR3N_Msb2-CT	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit <i>msb2</i> -Insert	Diese Arbeit
pDHB1_Sho1	Yeast two-hybrid Bait Vektor mit <i>sho1</i> -Insert	
pPR3N_Sho1	Yeast two-hybrid Prey Vektor mit <i>sho1</i> -Insert	
Konstrukte zur <i>B. cinerea</i> Mutagenese		
Name	Anmerkung	Herkunft
pNAH-OGG	Vektorrückrat YRC, Amplifikation der ( <i>PtrpC::hph</i> )-Kassette	Schumacher <i>et al.</i> , 2012
pNAH- <i>bic5</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>bic5</i> Deletion	Müller, 2012
pNAH- <i>bic8</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>bic8</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>plc1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>plc1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>cel1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>cel1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>af1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>af1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>lpl1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>lpl1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>cda1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>cda1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>gis1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>gis1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>gis2</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>gis2</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>gis3</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>gis3</i> Deletion	Diese Arbeit

## Material & Methoden

pNAH- <i>gic1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>gic1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>gic2</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>gic2</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>gim1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>gim1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>arp1</i> _KO	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>arp1</i> Deletion	Diese Arbeit
pvel2_KO	Über seamless cloning erstelltes Konstrukt zur <i>vel2</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAH- <i>sho1</i> _KO-d	Über YRC erstelltes Konstrukt zur <i>sho1</i> Deletion	Diese Arbeit
pNAN- <i>sho1</i> _KO-NatR	Konstrukt zur Erstellung der <i>msb2/sho1</i> Doppelmutante	Peter, 2009
pbcps13-CiL_natR	Zur Amplifikation der ( <i>PtrpC::nat1::Tgluc</i> )-Kassette	Schumacher <i>et al.</i> 2016b
pUC57_b_recomb	Codon-optimierte Hyg-Kassette (PoliC::hph::TtrpC)	AG Hahn, unveröffentlicht
pNAN- <i>sho1</i>	Konstrukt zur <i>sho1</i> Komplementation in <i>niiA</i>	Nixdorf, 2013
psho1-CIL	Über YRC erstellt, zur <i>in loco</i> Komplementation von <i>sho1</i>	Diese Arbeit
pNAN-VEL1-GFP	Konstrukt zur Überexpression von des GFP-fusionierten VEL1	Schumacher <i>et al.</i> 2012
pNAN-VEL2-GFP	Konstrukt zur Überexpression von des GFP-fusionierten VEL2	Schumacher <i>et al.</i> 2012
pNAN-LAE1-GFP	Konstrukt zur Überexpression von des GFP-fusionierten LAE1	Schumacher <i>et al.</i> 2012
pbcvel1-IL-COM1	Konstrukt zur <i>in loco</i> Komplementation von <i>vel1</i>	Schumacher <i>et al.</i> 2012

### 6.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Übernacht-Kulturen erfolgte mit dem Reaktionskit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel).

Zur Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* wurden 2x2 ml einer Übernacht-Kultur 5.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,2 g Glasperlen (0,2-0,5 mm) wurde 4-5 min kräftig gevortext. Danach wurden erneut 100 µl STET-Puffer zugegeben und gevortext. Nach 3 min Inkubation bei 95 °C wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach der Zugabe von 50 µl Ammonium-Acetat (7,5 M) 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm wurden 100 µl des Überstands in einem neuen Reaktionsgefäß nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100%, p.a.) 1 h bei -70 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl Ethanol (70%; p.a.) gewaschen, 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 6.4.4 Isolierung genomischer DNA aus *Botrytis*

200 µl einer *B. cinerea* Sporensuspension oder mit einer Pinzette abgezapftes Myzel wurden in ein mit ca. 500 µl Glasperlen (0,75-1 mm) befülltes 2 ml-Eppendorf SafeLock Gefäß gegeben. Es wurden 200 µl CTAB-Lösung dazugegeben und die Zellen durch 45 sec Rotation in einem RiboLyser auf Stufe 6,5 aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm folgte die Zugabe von 400 µl Chloroform, kräftiges Vortexen und erneute Zentrifugation von 2 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 2 µl RNase A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 315 µl Isopropanol und kräftigem Vortexen wurde die DNA für 1 h

bei -20°C gefällt. Danach wurde die Probe für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit 300 µl Ethanol (70%; p.a.) überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (1 min bei 14.000 rpm) wurde der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde je nach Größe in 20-50 µl H<sub>2</sub>O (60°C) gelöst. Die Überprüfung von 2 µl der DNA erfolgte auf einem 1%-Agarose-Gel.

#### 6.4.5 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen zur Kontrolle von Plasmiden und PCR-Produkten, sowie zur Identifizierung von Klonen im Yeast two-hybrid screening wurden durch die Firma SEQ-IT GmbH & Co. KG (Kaiserslautern) durchgeführt.

### 6.5 Klonierung von Konstrukten zur Mutagenese von *B. cinerea*

#### 6.5.1 Erstellung von *B. cinerea* Deletionsmutanten

Zur homologen Rekombination in *B. cinerea* werden 400-600 bp große homologe DNA-Sequenzen benötigt. Werden beispielweise Resistenzkassetten zwischen zwei Fragmente der nicht codierenden ein Zielgen flankierenden Regionen kloniert, wird durch homologe Rekombination die codierende Sequenz vollständig deletiert.

Um die Konstrukte zur Deletion der Gene *bic8* (Bcin13g03110), *cel1* (Bcin09g01110), *af1* (Bcin14g05510), *lpl1* (Bcin13g03170), *cda1* (Bcin03g05710), *gis1* (Bcin09g011150), *gis2* (Bcin02g02450), *gis3* (Bcin02g05630), *gic1* (Bcin13g03890), *gic2* (Bcin08g03740), *gim1* (Bcin01g05760), *arp1* (Bcin09g04130), *cls-N* (Bcin11g02030) und *sho1* (Bcin08g05150) zu klonieren, wurden die nicht codierenden 5'- und 3'-Flanken so amplifiziert, dass sie mit ca. 30 bp Überhängen für yeast recombinational cloning (YRC) geeignet waren (Oldenburg *et al.*, 1997). Die Überhänge waren so konzipiert, dass die Genflanken auf beiden Seiten einer Resistenzkassette in einen Shuttlevektor eingebaut wurden. Die PCR Produkte der Flanken sind jeweils durch die Kombinationen X\_5F + X\_5R, bzw. X\_3F + X\_3R entstanden, wobei X für das jeweilige Gen steht. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*PtrpC::hph*, 1394 bp) wurde mit den Primern pTRPC-F + HPH-R, und das Vektorrückgrat des Shuttle-Vektors pRS426 mit der Kombination backbone\_fw + backbone\_rev (5518 bp) mit dem Plasmid pNAH-OGG als Template amplifiziert. Die vier PCR-Produkte wurden jeweils gleichzeitig in Hefe transformiert, wo mittels YRC die Plasmide pNAH-X\_KO zusammengesetzt wurden. Die linearen KO-Konstrukte (5'-Flanke-Kassette-3'-Flanke) wurden für die Transformation mit den erstellten Plasmiden mithilfe der Primer X\_5F + X\_3R hergestellt. Alternativ wurden zwei PCR-Produkte mit je einer Flanke und einem mit 639 bp überlappenden Teil der Kassette mithilfe der Kombinationen X\_5F+ Split-Hyg\_rev und X\_3R + Split-Hyg\_fw hergestellt. Diese wurden simultan und äquimolar für die Transformation nach

der Split-Marker-Rekombination zur effizienteren Integration von KO-Konstrukten eingesetzt (Aragona und Valente, 2015).

Die Deletion von **bic5** (Bcin06g05140) erfolgte analog mit dem PCR-Produkt (*bic5\_5F* + *bic5\_3R*) des in eigenen Vorarbeiten erstellten Plasmids pNAH-*bic5\_KO*. Für den Nachweis der korrekten Integration dieser Deletionskonstrukte wurden Primer verwendet, die vor der 5'-Flanke (oder nach den 3'-Flanke auf dem komplementären Strang) an die gDNA-Sequenz binden (Primer X\_KOF bzw. X\_KOR) und mit einem Primer kombiniert, der innerhalb der Resistenzkassette lag (*Hyg\_screen\_rev* bzw. *Hyg\_screen\_fw*). Die Deletion von **plc1** (Bcin03g00280) erfolgte ebenfalls analog zur oben beschriebenen Methode mithilfe einer Codon-optimierten Hygromycin-Resistenzkassette (*PoliC::hph::TtrpC*) D mit den Primern *PoliC\_for* + *TtrpC\_rev* mit dem Plasmid pUC57\_b\_recomb als Template amplifiziert. Die korrekte Integration wurde mithilfe der Primerkombination *plc1-multi\_KOR* + opt-*Hyg\_screen* verifiziert. Wildtyp-Kopien der Gene wurden mit Primerpaaren (*X\_wt\_F* + *X\_wt\_R*) überprüft, die innerhalb der codierenden Region der Zielgene lagen.

Die Klonierung des Konstrukts zur Deletion des Gens **vel2** verifiziert.(Bcin01g02730) wurde mithilfe des GeneArt® Seamless Cloning & Assembly Kit (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Anleitung durchgeführt. Die 5'-Flanke (*vel2\_5F* + *vel2\_5R*, 594 bp) und die 3'-Flanke (*vel2\_3F* + *vel2\_3R*, 561 bp) wurden zu beiden Seiten einer Hygromycin-Resistenzkassette (*PtrpC::hph::Tgluc*, 1955 bp, *vel2\_hphF* + *vel2\_hphR*) in das resultierende Plasmid p*vel2\_KO* eingebaut. Das KO-Konstrukt wurde mit den Primern *vel2\_5F* + *vel2\_5R* amplifiziert (2037 bp) und in den *B. cinerea* Wildtyp transformiert. Der Einbau der Hygromycin-Kassette (in entgegengesetzter Orientierung des Zielgens) wurde mithilfe der Primerkombination *vel2\_KOR* + Split-*Hyg\_rev* (1622 bp) verifiziert. Verlust des Wildtyp-Gens wurde mithilfe der Primer *vel2\_KOR* + *vel2\_wtF* (1023 bp Produkt nur beim Wildtyp-Gen) nachgewiesen.

Das Gen **vel3** (Bcin07g05880) wurde mittels eines über "overlap extension PCR" erstellten Split-Marker Deletions-Konstrukts durch Integration einer Codon-optimierten Hygromycin-Resistenzkassette (*PoliC::hph::TtrpC*) ausgeschaltet. Die Kassette (2221 bp) wurde mit den Primern *PoliC\_for* + *TtrpC\_rev* mit dem Plasmid pUC57\_b\_recomb als Template amplifiziert. Die 5'-Flanke des Zielgens (511 bp), welche mit dem 3'-Ende der Resistenzkassette (*PoliC*) überlappt, wurde mit den Primern *vel3\_5F* + *vel3\_5R* erstellt. Die 3'-Flanke mit einem Überhang zum 5'-Ende der Kassette (524 bp) wurde analog dazu mit den Primern *vel3\_3F* + *vel3\_3R* amplifiziert. Das 3'-Ende der Kassette (1377 bp) wurde mithilfe der Primer *vel3\_5F* + *hph\_split1* in einer PCR mit der 5'-Flanke the zu einem 1888 bp Produkt verschmolzen. Die 3'-Flanke wurde mit dem zweiten Teil der Kassette (1468 bp) mithilfe der Primer *vel3\_3R* + *hph\_split2* zu einem 1992 bp Fragment zusammengesetzt. Diese beiden PCR-Produkte mit einer Überlappung der Resistenzkassette von 624 bp wurden äquimolar in der

Transformation des *B. cinerea* Wildtyp B05.10 eingesetzt. Der korrekte Einbau der Resistenzkassette (in entgegengesetzter Richtung) anstelle des Zielgens wurde mit den Primern *vel3\_KOF* + *hph\_split1* überprüft (2066 bp). Der Verlust der Wildtypkerne wurde durch Fehlen eines Produkts bei PCR mit den Primern *vel3\_KOF* + *vel3\_wtR* (1372 bp Produkt beim Wildtyp) verifiziert.

### 6.5.2 Die *msb2/sho1* Doppeldeletion

Das Konstrukt zur Insertion der Nourseothricin-Resistenzkassette in die für *sho1* codierende Region (5'-Flanke - *PoliC::nat1::TtubB* - 3'-Flanke) wurde von Peter (2009) erstellt. Die Transformation der *B. cinerea msb2* Mutante (Leroch *et al.*, 2015) erfolgte mit einem PCR-Produkt der Primer *sho1\_Xba* und *sho1\_HindIII* mit dem Plasmid pNAN-*sho1\_KO*-NatR als Template. Die korrekte Integration wurde mit den Primern *oliC-F* + *sho1-KOF* (2750 bp) überprüft. Bei Verlust der Wildtypkerne wurde kein Produkt mit den Primern *sho1-RT-fw* + *sho1-RT-rev* amplifiziert.

### 6.5.3 Komplementation von Mutationen

Die Komplementation der *sho1* Mutante erfolgte mithilfe des von Nixdorf (2013) erstellten Plasmids pNAN-*sho1*. Das Konstrukt wurde für die Transformation in *sho1* mit SacII und ApaI aus dem Plasmid ausgeschnitten. Zur Überprüfung der korrekten Integration in den *niiA* Locus wurden die Primer KO\_NA\_Locus + *sho1\_RT\_fw* verwendet. Um nachzuweisen, dass nach der Einzelsporenisolation alle Zellkerne transformiert waren, wurde das durch die Integration deletierte *niiA* Gen kontrolliert. Die Kombination der Primer KO\_NA\_Locus + NA\_WT\_screen ergibt nur bei verbliebenen Wildtypkernen eine Bande von 1704 bp.

Um das Defekte *sho1* Gen in der *vel1\** Mutante zu ersetzen, erfolgte eine Komplementation *in locus* mit der intakten codierenden Sequenz von *sho1* gefolgt von einem *Tgluc* Terminator und einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Der resultierende Stamm *vel1\*::Sho1* ist in Abb. Anhang 3 dargestellt. Die für *sho1* codierende Region wurde mit den Primern *sho1\_CiL\_fw* (P6) + *sho1\_CiL\_rev* (P7) (1207 bp) amplifiziert, der *Tgluc* Terminator wurde zusammen mit der Resistenzkassette (*PtpC::nat1*) mit den Primern HPH-F + *Tgluc-F2* (1615 bp) mit dem Plasmid *pbcps13-CiL\_natR* als Template hergestellt. Die 3'-Flanke von *sho1* wurde mit den Primern *sho1\_CiL\_3F* (P10) + *sho1-KO\_3R* (P11); 633 bp amplifiziert. Die drei Fragmente wurden mittels YRC in das Vektorrückgrat des Plasmids pNAH-OGG eingebaut (siehe oben) und ergaben so das neue Plasmid *psho1-CiL*. Das Komplementationskonstrukt (3397 bp) wurde mit den Primern *sho1\_CiL\_fw* + *sho1-KO\_3R* amplifiziert, in *vel1\** und als Kontrolle in den Wildtyp B05.10 transformiert. Die korrekte Integration wurde mit den Primern *sho1-KO-R* + *split-nat\_rev* mit der Amplifikation eines 1600 bp großen Produkts nachgewiesen.

Zur Komplementation der *vel1\** Punktmutation wurde *vel1\** durch ein intaktes *vel1* Gen *in locus* ersetzt. Hierzu wurde das von Schumacher *et al.* (2012) verwendete Plasmid *pbcvel1-IL-COM1* (*vel1::PtrpC::nat1::Tgluc*) mit PvuII geschnitten in die *B. cinerea vel1\** Mutante transformiert. Der resultierende Stamm *vel1\*::VEL1* ist in Abb. Anhang 3 dargestellt.

#### 6.5.4 Erstellung von Mutanten mit GFP-Fusionsproteinen

Konstrukte, welche die GFP-markierten Fusionsproteine VEL1-GFP, VEL2-GFP and LAE1-GFP unter der Kontrolle des *oliC*-Promotors aus *A. nidulans* überexprimieren (pNAN\_VEL1-GFP, pNAN\_VEL2-GFP, pNAN\_LAE1-GFP; Schumacher *et al.*, 2015), wurden mittels SacII Restriktionsverdau linearisiert und bei der *B. cinerea* Transformation in den *niiA* Locus der *vel1\** und *vel2* Mutanten integriert. Die Integration der Konstrukte wurde durch GFP-Signale verifiziert. Transformanten, die homokaryotisch das *niiA* Gen verloren hatten, zeigten in einer PCR mit den Primern KO\_NA\_Locus + NA\_WT\_screen keine Bande.

### 6.6 Transformation der Mikroorganismen

#### 6.6.1 Transformation von *B. cinerea*

Es wurden 100 ml ME-Medium mit  $10^8$  Sporen angeimpft, und für 16 h schüttelnd (180 rpm) bei 20°C inkubiert. Die Suspension wurde am Folgetag in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet, das Pellet mit 0,6 M KCl/ 0,1 M Na(Pi) gewaschen und resuspendiert. Der Ansatz wurde bei 4.000 rpm für 10 min zentrifugiert und gewaschen, danach erneut zentrifugiert (10 min, 4.000 rpm). Danach wurde das Pellet in 20 ml 0,6 M KCl/ 0,1 M Na(Pi) mit 0,2 g Glucanex und 300 µl 1 M KOH resuspendiert, um die Zellwand abzubauen. Danach wurden die Zellen bei 2 h bei 22-23°C auf einem Rocky 3D-Shaker (Intensität 4,5) vorsichtig schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Protoplasten durch ein steriles Nylon-Netz (30 µm) gefiltert und mit kaltem TMS-Puffer aus dem Netz ausgespült. Nach einer Zentrifugation (5 min, 3500 rpm) bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml TMS-Puffer resuspendiert. Die Protoplasten wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach einer weiteren Wiederholung der Zentrifugation wurde durch Zugabe von TMS-Puffer eine Protoplastenkonzentration von  $2 \times 10^7$  Protoplasten/100 µl eingestellt. Für die Transformation der Protoplasten wurden jeweils 100 µl mit  $2 \times 10^7$  Protoplasten in Reaktionsgefäßen aliquotiert. Danach wurden jeweils 10-20 µg DNA (in 60 µl Tris-EDTA + 40 mM CaCl<sub>2</sub>) hinzugefügt und durch leichtes Anschnippen des Reaktionsgefäßes mit den Protoplasten vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden 160 µl PEG (60%) hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen folgten 20 min Inkubation bei RT. Danach wurden 680 µl TMS hinzugefügt, und der Ansatz nach dem Mischen für 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Mit einer Pipette wurde das PEG abgenommen und das Pellet in 200 µl TMS resuspendiert.



Der Ansatz wurde in 200 ml SH-Agar gegeben und mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hygromycin 17,5 µg/ml oder Nourseothricin 50 µg/ml) versetzt in Petrischalen gegossen. Nach ca. drei Tagen wurden einzelne im SH-Agar gekeimte putative Transformanten mithilfe eines Skalpell's ausgeschnitten und auf HA-Agar mit doppelter Antibiotika-Konzentration überführt.

Für den Erhalt homokaryotischer Stämme wurden möglichst wenige Sporen auf einer selektiven HA-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 20°C inkubiert. Mithilfe eines inversen Mikroskops wurden einzelne ausgekeimte Sporen markiert und einzeln auf selektive HA-Agarplatten überführt.

### **6.6.2 Transformation von *E. coli***

Bei der Transformation von *E. coli*-Zellen wurden chemisch kompetente Zellen 15 min auf Eis aufgetaut und die DNA (20 µl Ligationsansatz oder 5 µl Hefepiasmid bzw. ca. 5 ng Plasmid) zugefügt. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock bei 42°C für 90 s im Wasserbad. Danach wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und 800 µl ΨB-Medium hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37°C und 225 rpm wurden die Zellen bei 7.000 rpm 2 min abzentrifugiert, 850 µl des Mediums abgenommen, und die Zellen nach Resuspendieren auf Selektiv-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert.

### **6.6.3 Transformation von *S. cerevisiae***

Bei der Transformation von Hefezellen wurden 10 µl (0,5 µg) Plasmid DNA mit 50 µl denaturierter Herings DNA (5 min bei 95°C, 5 min auf Eis abgekühlt) gemischt. Zu dem Ansatz wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine große Hefekolonie gegeben. Nach dem Vortexen wurden 0,5 ml PLATE-Lösung hinzugefügt und erneut gevortext. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurde erneut gevortext und ein Hitzeschock von 15 min bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Danach wurden die Zellen bei 6.000 rpm 1 min abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig abpipettiert. Das Pellet wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf je nach Plasmid angepasste Selektionsplatten (SC-Medium +/- Histidin, Leucin, Tryptophan, Uracil) ausplattiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 28°C waren neue Kolonien gewachsen.

## **6.7 Allgemeine phänotypische Analysen**

### **6.7.1 Keimungstests, Hyphendifferenzierung und Penetration**

Die Inkubation der im Folgenden mikroskopierten Proben erfolgte bei 20°C in 100% Luftfeuchte im Dunkeln. Eine Quantifizierung der konidialen Keimung erfolgte nach 18 h Inkubation in 25 µl Tropfen einer Suspension von 1x10<sup>5</sup> Sporen/ml. Dabei wurde die

Keimung auf hydrophober Polypropylenfolie und hydrophilen Deckgläsern in GB5 mit und ohne Zucker (10 mM Fructose) unterschieden. Die Appressorienbildung (18-24 h) und die Bildung von infection cushions (48 h) wurde nach Inkubation in GB5 mit 25 mM Glucose auf Deckgläsern und auf mit Apfelwachs-beschichteten Objektträgern untersucht, die eingesetzte Sporenkonzentration betrug  $5 \times 10^4$  Sporen/ml. Um die Penetrationsfähigkeit zu testen, wurden präparierte Zwiebelepidermen mit der intakten konvexen Seite nach oben auf Objektträgern fixiert und anschließend für 30 min mit Wasserdampf (65°C) abgetötet. Anschließend wurden sie gründlich mit Wasser gespült. Nach kurzem Trocknen wurden 20 µl Tropfen einer Suspension von  $1 \times 10^4$  Sporen/ml in GB5 mit 1 mM Fructose auf die Epidermis pipettiert und nach 16 h zur Färbung extrazellulärer Hyphen und Sporen mit 10 µl Trypanblau versetzt. Nach einer Färbedauer von mindestens 20 min wurden die Tropfen vorsichtig mit H<sub>2</sub>O abgewaschen und mikroskopisch analysiert.

### **6.7.2 Fluoreszenzmikroskopische Analysen**

Es wurden  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in GB5 mit 25 mM Glucose als 25 µl Tropfen auf Deckgläser pipettiert und für 16 h bei 20°C in 100% Luftfeuchte im Dunkeln, oder im Licht inkubiert. Fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden am Mikroskop Axio Observer.A1 (Carl Zeiss AG) durchgeführt. GFP-Fluoreszenz wurde mithilfe eines Semrock GFP-A Basic Filter Sets (AHF Analysentechnik) sichtbar gemacht und mithilfe der AxioCam MRm und der dazugehörigen Software AxioVs40 V 4.8.2.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) dokumentiert.

### **6.7.3 Analysen des Wachstums und der lichtabhängigen Differenzierung**

Zur Untersuchung des vegetativen Wachstums wurden ME-Agarplatten und GB5-Agarplatten mit verschiedenen Stressinduktoren verwendet (vgl. Tab. 6). Die Inokulation der Platten erfolgte entweder mit 10 µl Tropfen einer Sporensuspension von  $1 \times 10^5$  Sporen/ml H<sub>2</sub>O oder mit Myzelplugs. Die Plugs (GB5 5 mM Glucose Agar, Ø 6 mm) waren 24 h zuvor mit 10 µl Tropfen ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml in H<sub>2</sub>O) angeimpft worden. Die radialen Myzeldurchmesser abzüglich der Tropfen- bzw. Plug-Größen wurden nach 72 h Inkubation im Dunkeln bei 20°C bestimmt. Für Sporulationstests wurden die ME-Platten weiter im Licht inkubiert und nach zehn Tagen fotografisch dokumentiert. Um die Sporenkonzentration zu bestimmen, wurden von diesen Agarplatten drei Stücke sporulierendes Myzel samt darunterliegendem Agar mit einem Korkbohrer ausgestochen und in ein mit 10 ml H<sub>2</sub>O gefülltes 50 ml Gefäß überführt. Nach 2x 30 sec Vortexen wurde die Sporenkonzentration mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Charakterisierung der Sklerotien-Bildung wurden Oxoid ME-Agarplatten mit je einem 10 µl Tropfen ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml in H<sub>2</sub>O) in der Mitte der Platte beimpft. Die Inkubation erfolgte für vier Wochen bei 15°C im Dunkeln.

#### **6.7.4 Analyse der pH-Wert-Änderung durch *B. cinerea* und Messung sekretierter organischer Säuren**

Unterschiedliche pH-Indikator-Agarplatten wurden mit Myzelplugs (GB5 5 mM Glucose, pH 5,5) inokuliert, welche 24 h zuvor mit 10 µl einer Suspension der Konzentration von  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in H<sub>2</sub>O beimpft worden waren. Der Farbverlauf wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten fotografisch dokumentiert. Der pH-Verlauf in Tropfen *in vitro* (auf Polypropylenfolie) und in Inokulationstropfen während der Infektion auf Blättern wurde mithilfe einer pH-Flachelektrode direkt auf der Oberfläche bestimmt (9 mm Inlab® Surface, Mettler-Toledo). Dazu wurden jeweils 20 µl Tropfen einer Sporenkonzentration von  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in GB5 mit 25 mM Glucose, oder ME auf die unterschiedlichen Oberflächen pipettiert und bei 20 °C in 100% Luftfeuchte im Laborlicht inkubiert.

Zur Bestimmung der durch *B. cinerea* sekretierten organischen Säuren wurden mehrere 30 µl Tropfen einer Sporensuspension von  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in 20% GB5 ohne KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit 25 mM Glucose auf Blätter bzw. Polypropylenfolie gesetzt und bei 20 °C in Feuchtkammern im Laborlicht inkubiert. Die Tropfen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Eine anschließende 10-minütige Zentrifugation (14.000 rpm, 5 min) diente dem Entfernen der festen Bestandteile der Proben. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mittels pH-Elektrode gemessen, 10 min bei 100 °C gekocht, erneut für 5 min zentrifugiert und anschließend bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Vor der Messung wurden die Proben aufgetaut, für 5 min zentrifugiert (14.000 rpm) und die Überstände danach durch Ionenchromatografie in Kooperation mit der Abteilung Pflanzenphysiologie (AG Neuhaus) analysiert. Citrat, Malat, Fumarat und Succinat wurden mithilfe einer Metrosep Organic Acids 250/7.8 Kationen-Austauschsäule (Metrohm) aufgetrennt. Zur Messung der späten Oxalat-Sekretion wurden 5 ml einer Flüssigkultur (Oxalat-Testmedium modifiziert nach Manteau *et al.*, 2003; vgl. Tab. 6)  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in 35 mm Petrischalen inkubiert. Nach 7 Tagen wurde jeweils 1 ml der Flüssigkeit abgenommen, für 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend zentrifugiert (14.000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde bei -20 °C eingefroren und vor der Messung durch Zentrifugation geklärt. Die Messung erfolgte mit einer Metrosep A Anionenaustauschsäule (Metrohm).

#### **6.7.5 Infektionstests, pH-Manipulation während der Infektion und DAB-Färbung**

Bei Standard-Infektionstests wurden 5-6 Wochen alte Tomatenblätter, Ackerbohnenblätter oder Gerbera-Petalen mit 20 µl Tropfen einer Sporensuspension ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) in GB5 mit 25 mM Glucose inokuliert. Alternative Sporenkonzentrationen oder Inokulationsmedien wie z.B. ME-Vollmedium sind angegeben. Die Verwundung von Blättern erfolgte vor der

Inokulation durch leichten Druck mit einem stumpfen Holzstab ( $\varnothing$  4 mm). Äpfel wurden mithilfe eines Korkbohrers verwundet. Infizierte Gewebe wurden bei 100% Luftfeuchte im Laborlicht bei 20°C inkubiert. Die in Diagrammen dargestellten Werte repräsentieren die radiale Ausbreitung der Läsionen abzüglich des Inokulationstropfens.

Zur Manipulation des pH-Werts in Inokulationstropfen während der Infektion wurden Blätter mit 20  $\mu$ l Tropfen einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml in GB5 mit 25 mM Glucose angeimpft. Nach 12 h Inkubation wurden die Inokulationstropfen alle 4 h bis zur Messung der Läsionen nach 48 h durch frische Tropfen durch frische Tropfen mit dem gewünschten pH-Wert (GB5 ohne Zucker) ersetzt. Zum Vergleich wurden Blätter infiziert, bei denen kein Austausch der Tropfen erfolgte.

Infizierte Tomatenblätter wurden zur Analyse der  $H_2O_2$ -Bildung für in DAB-Lösung im Dunkeln gefärbt (1 h) und anschließend in kochendem Ethanol (100%) entfärbt. Die durch Oxidation von DAB entstandene Braunfärbung wurde fotografisch dokumentiert.

## 6.8 Sekretom-Analyse

### 6.8.1 Herstellung von *Botrytis*-Exudaten

Tomaten- oder Ackerbohnenblätter wurden mit 20  $\mu$ l Sporensuspension ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) in GB5 mit 25 mM Glucose (oder in ME-Vollmedium) inokuliert und für 48 h im Licht bei 20°C in Feuchtkammern inkubiert. Die Tropfen wurden gesammelt und bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Whatman®-Papier gefiltert und sterilfiltriert (22  $\mu$ m Filterporen). Anschließend wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Exudate wurden für Sekretomanalysen zur Proteinextraktion und Proteaseaktivitätsmessungen verwendet.

### 6.8.2 Messung der Proteaseaktivität in *Botrytis*-Exudaten

Zur Bestimmung der Proteaseaktivität wurde die Anleitung des verwendeten Kits (EnzCheck® Protease Assay Kits E6638 green fluorescence (Thermo Fisher Scientific)) leicht modifiziert. Es wurde 50 mM Natrium-Citratpuffer auf die im Experiment angegebenen pH-Werte eingestellt und für die Messlösung verwendet. 100  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung der Exudate wurden in 96-Well-Platten mit 100  $\mu$ l Messlösung gemischt und nach einer Messung zum Zeitpunkt T=0 min bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach 45 min mithilfe des Plateraders SpectraMaxM2 (Molecular Devices) mit einem GFP-Filter.

### 6.8.3 Vorbereitung der Proben für die Massenspektroskopie (MS/MS)

Um eine quantitative MS/MS-Analyse mittels  $^{15}N$ -Markierung nach Mühlhaus *et al.* (2011) durchzuführen, wurden  $^{15}N$ -markierte Konidien durch Kultivierung von *B. cinerea* auf

<sup>15</sup>N-Vogel's Medium-Agarose-Platten generiert. Um <sup>15</sup>N-markierte Pflanzen zu erhalten wurden Tomatensamen (Sorte: Moneymaker) in hydroponischer <sup>15</sup>N-Hoagland Nährlösung kultiviert. Die Herstellung eines <sup>15</sup>N *on planta* Exudats erfolgte durch Tropfen-Inokulation von  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in <sup>15</sup>N-Vogel's Medium auf fünf Wochen alten <sup>15</sup>N-markierten Tomatenblättern. Nach 48 h wurden die Tropfen gesammelt, durch Whatman®-Papier gefiltert, sterilfiltriert und bei -80 °C eingefroren. Für eine <sup>15</sup>N *B. cinerea* Flüssigkultur (*in vitro*) wurden  $2 \times 10^6$  <sup>15</sup>N-Konidien für 32 h in Petrischalen mit 22,5 ml <sup>15</sup>N-Vogel's Medium inkubiert und anschließend bei -80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration dieser Rohexudate wurde mit dem Pierce 660 nm protein assay (Thermo Fisher Scientific) bestimmt und daraufhin jeweils 3 µg <sup>15</sup>N-markierten Proteine (Rohexudat *on planta*: Flüssigkultur = 3:1) mit Rohexudat der zu analysierenden Proben (Wildtyp, *lae1*, *vel1\**), in dem jeweils 4 µg Proteine enthalten waren, gemischt und zusammen aufgereinigt.

Proben für qualitative MS/MS-Analysen (*B. fabae* Projekt) wurden ohne Zugabe der <sup>15</sup>N-Mischung aufgereinigt. Zur Extraktion der Proteine wurde ein modifiziertes Protokoll nach Gonzalez-Fernandez und Jorin-Novo (2013) verwendet. Gefilterte *Botrytis*-Exudate wurden mit zwei Volumen 10% TCA, 80% Aceton über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Aufreinigung erfolgte mit Änderungen nach Wessel und Flügge (1984). Das Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer gelöst und gründlich mit vier Volumen Methanol und ein Volumen Chloroform gemischt. Die Probe wurde mit drei Volumen H<sub>2</sub>O gemischt und nach Zentrifugation die obere wässrige Phase vorsichtig verworfen. Die Chloroformphase und die Interphase wurden mit drei Volumen Methanol gemischt und die Proteine durch Zentrifugation präzipitiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend durch Schütteln in "Solubilization solution" gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce 660 nm protein assay (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Extrahierte Proteine wurden für 15 min bei 90 Volt in ein SDS-Polyacrylamidgel einlaufen gelassen. Das Gel wurde in 7% Eisessig, 40% Methanol fixiert und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Gefärbte Banden wurden ausgeschnitten, für 30 sec in 10% Eisessig, 25% Methanol entfärbt, und bis zur MS/MS-Analyse bei 4 °C gelagert.

### 6.8.4 Qualitative und Quantitative MS/MS-Proteomanalysen

Der tryptische Verdau, die MS/MS-Analyse und die Auswertung der Daten erfolgte im Rahmen einer Kooperation von der AG Molekulare Biotechnologie und Systembiologie (TU KL). Da in dieser Arbeit Ergebnisse der Analysen präsentiert werden, ist die Durchführung Vollständigkeitshalber im Anhang im Detail aufgeführt. Die Vorgehensweise beim Vergleich der Ergebnisse aus Transkriptom- und Sekretom-Analysen des VELVET-Projekts ist ebenfalls im Anhang beschrieben.

## 6.9 Genexpressionsanalysen

### 6.9.1 RNA-Extraktion

Für vergleichende *in vitro* Transkriptom-Analysen wurden  $2 \times 10^6$  *B. cinerea* Konidien in 22,5 ml GB5 mit 10 mM Glucose in Apfelwachs-beschichteten Petrischalen inkubiert (32 h). Die Inokulation für *in planta* Genexpressionsanalysen erfolgte mit dicht nebeneinander gesetzten 10  $\mu$ l Tropfen GB5 mit 10 mM Glucose einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml. Die Isolation der RNA infizierter Tomatenblätter erfolgte nach 24 h (VELVET-Projekt), bzw. von infizierten Ackerbohnenblättern nach 48 h (*B. fabae*-Projekt). Je nach Bedingung wurden drei bis vier biologische Replikate erstellt, welche bei *in planta* Analysen jeweils aus mindestens drei verschiedenen infizierten Blättern gepooled wurden. Die RNA aus infizierten Blättern wurde mit dem NucleoSpin® RNA plant Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt, und die Qualität und Quantität mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer, sowie auf einem denaturierenden RNA-Agarosegel kontrolliert.

### 6.9.2 qRT-PCR

Die Synthese der cDNA aus jeweils 1  $\mu$ g RNA erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD). Die anschließende qRT-PCR wurde mit dem iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD) in einem BIO-RAD MyIQ Real-Time-PCR-Cycler durchgeführt. Um aus den gemessenen CT-Werten die Expressionsänderung zu bestimmen, wurde die  $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) angewandt. Die Werte wurden gegen die Referenzgene Aktin (Bcin16g02020) und Elongationsfaktor 1- $\alpha$  (Bcin09g05760) normalisiert und auf eine Bedingung des Wildtyps bezogen logarithmisch dargestellt. Verwendete Primer sind in Tab. 10 aufgelistet.

### 6.9.3 RNAseq Analysen

#### 6.9.3.1 Alignments und Berechnung statistisch signifikanter Expressionsänderungen

Für RNAseq basierte Transkriptom-Analysen wurde RNA an die Firma BGI (Shenzhen, CHN) geschickt, mittels Illumina TruSeq sequenziert und die Rohdaten in der AG Hahn analysiert. Die erhaltenen Sequenzen der 100 bp paired reads wurden von K. Klug mit FastQC (Babraham Bioinformatics, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) auf ihre Qualität überprüft. Die Daten wurden als paired reads in das Programm CLC Genomics Workbench importiert. Basierend auf der Qualitätskontrolle wurden alle reads mittels der Funktion „NGS core tools trim sequences“ am 5'-Ende um 15 bp gekürzt, um ein besseres Mapping zu erreichen. Das Referenzalignment der reads erfolgte mit einer unveröffentlichten Vorversion der neuesten annotierten Genom-Sequenz des *B. cinerea* Stamms B05.10 (van Kan *et al.*, 2017; [http://fungi.ensembl.org/Botrytis\\_cinerea/Info/Index](http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/Info/Index)). In den

Mapping-Einstellungen wurden dabei eine „length fraction“ von 0,95 und eine „similarity fraction“ von 0,96 festgelegt was bedeutet, dass im Alignment eines reads maximal drei Fehler erlaubt sind. Paired reads wurden doppelt gezählt und auch broken reads in die Analyse einbezogen. Mit der Software CLC wurden verschiedene Experimente zum Vergleich von Datensets aufgesetzt und x-fache Expressionsänderungen (fold changes) errechnet. Es wurden beispielweise alle Replikate des Wildtyps als Gruppe mit den Replikaten von *vel1\**, *lae1* oder *vel1* als voneinander getrennte Gruppen verglichen. Die Normalisierung der Expressionswerte (mapped reads) „by totals“ wurde wie die statistische Analyse mittels Baggerly's Test in CLC durchgeführt. Gene, die im Mittel der Proben einer Gruppe einen RPKM-Wert >5 (Mortazavi *et al.*, 2008) aufwiesen, wurden als exprimiert betrachtet und in die Analyse einbezogen. Nur Werte, die mit einem FDR-corrected p-value <0,05 statistisch signifikant waren, wurden auch ausgewertet.

### **6.9.3.2 Funktionelle Klassifizierung und Erstellen einer RNAseq-Auswertungstabelle**

Eine Klassifizierung aller Gene/Proteine des Referenzgenoms in die funktionellen Gruppen CAZymes, Proteasen, Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus, mit Sekundärmetabolismus in Verbindung stehende Proteine, Cytochrom P450 Monooxygenasen, Transporter, Stress/Detoxifizierung, Signalling, Transkriptionsfaktoren, Methyltransferasen und Primärmetabolismus erfolgte händisch. Hierzu wurden Informationen über die putative Funktion aus bereits im Vorfeld erstellten Listen (Amselem, 2011; Leroch *et al.*, 2013; Stephenson, 2015), sowie neu durchgeführten Analysen einzelner Gene zusammengefasst und in Spalten den 11.990 vorhergesagten Gene der verwendeten Annotation gegenübergestellt (Tab. RNAseq, digitaler Angang). Die Definition, ob ein Protein *in silico* als sekretiert vorhergesagt ist, wurde als separate Einteilung durchgeführt und kann mit anderen funktionellen Gruppen überlappen. In diese Tabelle wurden zusätzlich auf (von K. Klug durchgeführten) BLAST-Analysen basierend (Altschul *et al.*, 1990) die Gen-Identifikations-Nummern (IDs) anderer B05.10 Genom-Versionen, sowie des *B. cinerea* Stamms T4 integriert (Amselem *et al.*, 2011; Staats und van Kan, 2011; van Kan *et al.*, 2017; <https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Botrytis/Sequences-Databases>).

Die Enrichment-Analyse der differenziell exprimierten funktionellen Gruppen wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten Z-Test durchgeführt ( $p < 0,001$ ) ([www.socscistatistics.com](http://www.socscistatistics.com)). Der Anteil differenziell exprimierter Gene einer Gruppe in Bezug auf die Gesamtanzahl differenziell exprimierter Gene wurde dabei mit dem Anteil der gesamten funktionellen Gruppe in Bezug auf alle exprimierten Gene verglichen.

### **6.9.3.3 DESeq Genexpressionsanalyse**

Die RNAseq-Mappings des VELVET-Projekts wurden im Rahmen einer Kooperation zusätzlich von D. Zimmer mit dem Bioconductor package DESeq2 v1.14.1. nach Love *et al.* (2014) ausgewertet.

## **6.10 Yeast two-hybrid Protein-Interaktionsstudien**

Yeast two-hybrid Analysen zur direkten Protein-Protein Interaktion wurden mithilfe der DUALhybrid, DUALmembrane und DUALhunter Screening Kits (Dualsystems Biotech) entsprechend der Anleitung nach dem Split-Ubiquitin System (Johnson *et al.*, 1994) durchgeführt. Die verwendeten Vektoren sind jeweils angegeben.

Beim cDNA-Datenbank Screening wurde der Bait-Vektor pDHB1-Msb2-CT eingesetzt. Die Herstellung der cDNA-Bank, welche NubG-fusionierte cDNA Inserts in pPR3N Prey-Vektoren enthält, erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit der AG Tudzynski (Uni Münster) durch die Firma Dualsystems Biotech. Das Protokoll zur Durchführung wurde leicht modifiziert dem DUALmembrane Starter Kit User Manual (Dualsystems Biotech) entnommen (vgl. Müller, 2012).

## **6.11 BMP1-Phosphorylierungsstudie**

Zur Analyse der BMP1-Phosphorylierung wurden je 22,5 ml GB5 10 mM Fructose Flüssigkultur mit  $1 \times 10^6$  Sporen in Apfelwachs-beschichteten Petrischalen für 6 h bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Die Keimlinge wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischalen abgelöst, in 50 ml Gefäße überführt, abzentrifugiert (4.000 rpm, 5 min bei 4°C) und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschriff in 20 ml H<sub>2</sub>O und ein erneuter Zentrifugationsschritt (4.000 rpm, 5 min bei 4°C). Der Überstand wurde entfernt und die Proben über Nacht lyophilisiert. Analog dazu wurden  $4 \times 10^7$  ruhende Sporen ebenfalls lyophilisiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine wie in 6.8.3 beschrieben (MS) extrahiert und die Konzentration bestimmt. Es wurden je 20 µg der Proben mit Lämmli-Puffer gemischt, 5 min bei 95°C gekocht und neben dem PageRuler 26619 (Thermo Fisher Scientific) auf ein SDS-Polycrylamidgel geladen. Die Proteine wurden erst 20-30 min bei 80 V, dann ca. 1 h bei 120 V aufgetrennt. Nach 30 min Schütteln in einem Fixierbad (40% Methanol, 7% Essigsäure) wurde das Gel ca. 1 h in 40 ml Coomassie-Lösung/ 10 ml Methanol gefärbt. Die Entfärbung erfolgte ca. 20 sec mit 10% Essigsäure/ 25% Methanol. Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Westernblot zwischen zwei Stapeln Whatman®-Papier in einer mit 1x Transferpuffer gefüllten Kammer bei 200 mA für 2,5 h. Anschließend wurden die Membranen gewaschen (5 min in TBS, 5 min in TBST, 5 min in TBS) und mit 3% BSA (in TBST) für 1 h unter leichtem Schütteln geblockt (40 rpm). Die Membran wurde 3x mit TBST gewaschen und dann über Nacht mit dem



primären Antikörper (Phospho-p-44/42 MAPK Antibody (Cell Signaling) aus Hase) in einer Verdünnung von 1:1.000 in 3% BSA in TBST inkubiert (4°C, 50rpm). Nach erneutem Waschen (siehe oben) erfolgte die Inkubation mit den 1:2.000 in 3% BSA in TBST verdünnten sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG, AP-linked Antibody (Cell Signaling) aus Ziege) für etwa 1-2 h. Die Detektion der alkalischen Phosphatase Aktivität erfolgte mittels Chemilumineszenz.

## 6.12 Statistische Analysen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Diagramme bzw. Graphen zeigen jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei biologischen und mindestens zwei technischen Replikaten. Die phänotypische Analyse neuer *Botrytis* Mutanten wurde (sofern verfügbar) mit mindestens zwei bis drei Stämmen mit korrekter Integration des Konstrukts ohne Wildtypkerne und bei Deletionsmutanten zusätzlich mit zwei Transformanten mit ektopischer Integration desselben KO-Konstrukts durchgeführt. Nachfolgend wurden die Analysen einer repräsentativen Mutante gezeigt. Signifikanztests wurden mithilfe von Microsoft Excel mit einem ungepaarten, zweiseitigen, heteroskedastischen T-test durchgeführt.

## 6.13 Datenverarbeitung und bioinformatische Software

Berechnungen und die Erstellung von Diagrammen, Graphen und Tabellen erfolgten mit Microsoft Excel 2013. Bildbearbeitungen wurden mit Microsoft PowerPoint 2013 und CorelDraw Graphics Suite X7 durchgeführt.

Zur Planung und Visualisierung molekularbiologisch basierter Analysen wie beispielweise *in silico* Erstellung von Konstrukten, Auswertung von Sequenzierungen, Alignments und Primerdesign wurden die bioinformatischen Programme SnapGene® 3.3.4 (GSL Biotech LLC), Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed Central) und CLC Genomics Workbench 7.5.2 (Quiagen Bioinformatics) verwendet.

## 7. Literaturverzeichnis

- Agrios G. (2005).** Plant Physiology. 5th Edition. Academic Press, San Diego, London, New York, Sydney, Tokio, Toronto.
- Ahmed Y.L., Gerke J., Park H.-S., Bayram Ö., Neumann P., Ni M., Dickmanns A., Kim S.C., Yu J.H., Braus G.H., Ficner R. (2013).** The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- $\kappa$ B. *PLoS Biology* 11(12):e1001750.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005).** Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim, Deutschland; ISBN:978-3-527-31160-6.
- Alkan N., Espeso E.A., Prusky D. (2013).** Virulence Regulation of phytopathogenic fungi by pH discoveries. *Antioxidants and Redox Signalling* 19(9):1012-1025.
- Alkan N., Fluhr R., Sherman A., Prusky D. (2008).** Role of ammonia secretion and pH modulation on pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21:1058-1066.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Amselem J., Cuomo C. A., van Kan J. A. L., Viaud M., Benito E. P., Couloux A., Coutinho P. M., de Vries R. P., Dyer P. S., Fillinger S., Fournier E., Gout L., Hahn M., Kohn L., Lapalu N., Plummer K. M., Pradier J.-M., Quévillon E., Sharon A., Simon A., ten Have A., Tudzynski B., Tudzynski P., Wincker P., Andrew M., Anthouard V., Beever R. E., Beffa R., Benoit I., Bouzid O., Brault B., Chen Z., Choquer M., Collémare J., Cotton P., Danchin E. G., Da Silva C., Gautier A., Giraud C., Giraud T., Gonzalez C., Grossetete S., Güldener U., Henrissat B., Howlett B. J., Kodira C., Kretschmer M., Lappartient A., Leroch M., Levis C., Mauceli E., Neuvéglise C., Oeser B., Pearson M., Poulain J., Poussereau N., Quesneville H., Rascle C., Schumacher J., Ségurens B., Sexton A., Silva E., Sirven C., Soanes D. M., Talbot N. J., Templeton M., Yandava C., Yarden O., Zeng Q., Rollins J. A., Lebrun M. - H., Dickman M. (2011).** Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* 7(8):1-27.
- Aragona M. und Valente M.T. (2015).** Genetic transformation of the tomato pathogen *Pyrenochaeta lycopersici* allowed gene knockout using a split-marker approach. *Current genetics* 61(2):211-220.
- Arenas C.Y., Kalkman R.I.C.E., Schouten A., Dieho M., Vredendregt P., Uwumukiza B., Ruiz O.M., van Kan A.L.J. (2010).** Functional analysis and mode of action of phytotoxic *NEP1*-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74:376e386.
- Backhouse D., Willems H.J. (1984).** A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. *Canadian Journal of Microbiology* 30:171-178.
- Bayram Ö. und Braus G.H. (2012).** Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiology Reviews* 36:1-24. Review.
- Bayram Ö., Krappmann S., Ni M., Bok J., Helmstaedt K., Valerius O., Braus-Stromeyer S., Kwon N.J., Keller N.P., Yu J.H., Braus G.H. (2008).** VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320:1504-1506.
- Bayram Ö., Sarikaya-Bayram Ö., Ahmed Y. L., Maruyama, J., Valerius O., Rizzoli S.O., Ficner M., Irniger S., Braus G.H. (2012).** The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genetics* 8:e1002816.
- Becker G.W. (2008).** Stable isotopic labeling of proteins for quantitative proteomic applications. *Briefings in Functional Genomics* 7(5):371-82.
- Benito E.P., ten Have A., van 't Klooster J.W., van Kan J.A. (1998).** Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104:207-220.
- Bi F., Barad S., Ment D., Luria N., Dubey A., et al. (2016).** Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 17:1178-1195.
- Billon-Grand G., Poussereau N. & Fevre M. (2002).** The extracellular proteases secreted *in vitro* and *in planta* by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology* 150:507-511.
- Billon-Grand G., Rascale C., Droux M., Rollins J.A., Poussereau N. (2012).** pH modulation differs during sunflower cotyledon colonization by the two closely related necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Plant Pathology* 13(6):568-578.

- Blanco-Ulate B.**, Molares-Cruz A., Amrine K.C.H., Labavitch J.M., Powell A. L.T., Cantu D. (2014). Genome-wide transcriptional profiling of *Botrytis cinerea* genes targeting plant cell walls during infections of different hosts. *Frontiers in Plant Science* 5:435.
- Brito N.**, Espino J.J. & Gonzales C. (2006). The endo-beta-1,4- xylanase Xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19:25-32.
- Calvo A. und Cary W.** (2015). Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Frontiers in Microbiology* 62(6):10.3389.
- Campbell N.A.**, Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B. (2009). *Biologie*, 8. Auflage, Pearson Education Deutschland GmbH. München, Deutschland; ISBN: 978-38273-7287-1.
- Cessna S.G.**, Sears V.E., Dickman M.B., Low P.S. (2010). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12: 2191-2200.
- Chen C.B.**, Harel A., Gorovoits R., Yarden O., and Dickman M.B. (2004). MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing. *Molecular Plant Microbe Interaction* 17:404-413.
- Chen R.E. und Thorner J.** (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773(8):1311-1340.
- Choi J.**, Park J., Kim D., Jung K., Kang S., Lee Y-H. (2010). Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics* 11:105.
- Choquer M.**, Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.M., Simon A., Viaud M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 277(1):1-10.
- Cousin A.**, Mehrabi R., Guilleroux M., Dufresne M., Van der Lee T., Waalwijk C., Langin T., Kema G.H.J. (2006). The MAP kinase-encoding gene *MgFus3* of the non-appressorium phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* is required for penetration and in vitro pycnidia formation. *Molecular Plant Pathology* 7:269-278.
- Cullen P.J.**, Sabbagh W., Graham E., Irick M.M., von Olden E.K., Neal C., Delow J., Bradwell L, Sprague G.F. (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes and Development* 18:1695-1708.
- Davidson J.A.**, Pande S., Bretag T.W., Lindbeck K.D., Krishna-Kishore G., (2004). Biology and management of *Botrytis* spp. in legume crops. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers 295-311.
- Davidzon M.**, Alkan N., Kobiler I., Prusky D. (2010). Acidification by gluconic acid of mango fruit tissue during colonization via stem end infection by *Phomopsis mangiferae*. *Postharvest biology and technology* 55:71-77.
- Dalmais B.**, Schumacher J., Moraga J., Le Pêcheur P., Tudzynski B., Collado I.G., Viaud M. (2011). The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology* 12(6):564-579.
- de Jonge R.**, van Esse HP., Kombrink A., Shinya T., Desaki Y., Bours R., van der Krol S., Shibuya N., Joosten M.H., Thomma B.P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329:953-955.
- Dean R.**, van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.
- Di Pietro A.**, Garcia-Maceira F.I., Meglecz E., Roncero M.I.G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular microbiology* 39(5):1140-52.
- Doehlemann G.**, Berndt P., Hahn M. (2006). Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology* 59(3):821-835.
- Doss R.P.**, Deisenhofer J., Krug von Nidda H-A., Soeldner A.H., McGuire R.P. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63: 687-691.
- Doss R.P.**, Potter S.W., Chastagner G.A., Christian J.K. (1993). Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1786-1791.
- Doss R.P.**, Potter S.W., Soeldner A.H., Christian J.K., Fukunaga L.E. (1995). Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 260-265.
- Elad Y.**, Pertot I., Prado A. M. C., Stewart A. (2016). Plant hosts of *Botrytis* spp. In: Fillinger S., Elad Y. (eds), *Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*, 413-486. Springer, Switzerland.

- Espeso E. A. und Arst H. N. jr. (2000).** On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Molecular and Cellular Biology* 20(10):3355-3363.
- Espino J.J., Gutiérrez-Sánchez G., Brito N., Shah P., Orlando R., González C. (2010).** The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10:3020-3034.
- Fawcett H.C., Finn D.R., Spencer M.D. (1971).** Weyerone increase in leaves of broad bean (*Vicia faba L.*) after infection by *Botrytis fabae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1:163-166.
- Ferrari S., Savatin D.V., Sicilia F., Gramegna G., Cervone F., De Lorenzo G. (2013).** Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* 4:49.
- Fernández-Acero F.J., Colby T., Harzen A., Carbú M., Wieneke U., Cantoral J.M., Schmidt J. (2010).** 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *Proteomics* 10:2270-2280.
- Fernández-Álvarez A., Marín-Menguiano M., Lanver D., Jiménez-Martín A., Elías-Villalobos A., Pérez-Pulido A.J., Kahmann R., Ibeas J.I. (2012).** Identification of O-mannosylated virulence factors in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens* 8(39):e1002563.
- Finn R.D., Coghill P., Eberhardt R. Y., Eddy S. R., Mistry J., Mitchell A. L., Potter S. C., Punta M., Qureshi M., Sangrador-Vegas A., Salazar G. A., Tate J., Bateman A. (2016).** The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research* 44:279-285.
- Frías M., González C., Brito N. (2011).** BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist* 192:483-495.
- Frias M., González M., González C., Brito N. (2016).** BcIEB1, a *Botrytis cinerea* secreted protein, elicits a defense response in plants. *Plant Science* 250:115-124.
- Gerke J. und Braus G.H. (2014).** Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(20):8443-8455.
- Giaever G.,** Chu A.M., Ni L., Connelly C., Riles L., Véronneau S., Dow S., Lucau-Danila A., Anderson K., André B., Arkin A.P., Astromoff A., El-Bakkoury M., Bangham R., Benito R., Brachat S., Campanaro S., Curtiss M., Davis K., Deutschbauer A., Entian K.D., Flaherty P., Foury F., Garfinkel D.J., Gerstein M., Gotte D., Güldener U., Hegemann J.H., Hempel S., Herman Z., Jaramillo D.F., Kelly D.E., Kelly S.L., Kötter P., LaBonte D., Lamb D.C., Lan N., Liang H., Liao H., Liu L., Luo C., Lussier M., Mao R., Menard P., Ooi S.L., Revuelta J.L., Roberts C.J., Rose M., Ross-Macdonald P., Scherens B., Schimmack G., Shafer B., Shoemaker D.D., Sookhai-Mahadeo S., Storms R.K., Strathern J.N., Valle G., Voet M., Volckaert G., Wang C.Y., Ward T.R., Wilhelmy J., Winzeler E.A., Yang Y., Yen G., Youngman E., Yu K., Bussey H., Boeke J.D., Snyder M., Philippsen P., Davis R.W., Johnston M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896):387-91.
- Gioti A., Simon A., Le Pêcheur P., Giraud C., Pradier J.M., Viaud M., Levis C. (2006).** Expression profiling of *Botrytis cinerea* genes identifies three patterns of up-regulation in planta and an FKBP12 protein affecting pathogenicity. *Journal of Molecular Biology* 358(2):372-86.
- Giridhar M. (2016).** Mutagenesis of genes related to the Velvet complex in *Botrytis cinerea*. Masterarbeit. AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- González M., Brito N., González C. (2014).** Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology* 12(14):254.
- González M, Brito N, González C. (2017).** The *Botrytis cinerea* elicitor protein BcIEB1 interacts with the tobacco PR5-family protein osmotin and protects the fungus against its antifungal activity. *New Phytologist* 215(1):397-410.
- González C., Brito N., Sharon A. (2015).** Infection process and fungal virulence factors. In *Botrytis- the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems* eds Fillinger S., Elad Y., editors. Springer, Berlin 229-246.
- González-Fernández R.und Jorrín-Novo J.V. (2013).** Proteomic protocols for the study of filamentous fungi. In: Gupta V. K. (eds.), *Laboratory protocols in fungal biology: Current methods in fungal biology*, 299-308. Springer Science & Business Media, Dordrecht.
- González-Fernández R., Valero-Galván J., Gómez-Gálvez J., Jorrín-Novo J.V. (2015).** Unraveling the *in vitro* secretome of the phytopathogen *Botrytis cinerea* to understand the interaction with its hosts. *Frontiers in plant science* 6(839).
- Govrin E.M. und Levine A. (2000).** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology* 13:751-757.

- Govrin E.M., Rachmilevitch S., Tiwari B.S., Solomon M., Levine A. (2006).** An Elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology* 96(3):299-307.
- Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998).** MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1264-1300. Review.
- Hadas Y., Goldberg I., Pines O., Prusky D. (2007).** Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples. *Phytopathology* 97 384-390.
- Hahn M. (2014).** The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7:133-141.
- Hamel L.P., Nicole M.C., Duplessis S., Ellis B.E. (2012).** Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell* 24(4):1327-51. Review.
- Han Y., Joosten H.J., Niu W., Zhao Z., Mariano P.S., McCalman M., van Kan J., Schaap P.J., Dunaway-Mariano D. (2007).** Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *Journal of Biological Chemistry* 282: 9581-9590.
- Hargreaves J.A., Mansfield J.W., Rossall S. (1977).** Changes in phytoalexin concentrations in tissues of the broad bean plant (*Vicia faba* L.) following inoculation with species of *Botrytis*. *Physiological Plant Pathology* 11: 227-242.
- Harrison J.G. (1984).** *Botrytis cinerea* as an important cause of chocolate spot in field beans. *Transactions of the British Mycological Society* 83(4):631-637.
- Harrison J.G. (1988).** The biology of *Botrytis spp.* on *Vicia* beans and chocolate spot disease - a review. *Plant Pathology* 37: 168-201. Review.
- Hauptle M.A. und Hennet T. (2009).** Congenital disorders of glycosylation: an update on defects affecting the biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharides. *Human Mutations* 30:1628-1641.
- Heard S., Brown N.A., Hammond-Kosack K. (2015).** An interspecies comparative analysis of the predicted secretomes of the necrotrophic plant pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS One* 10(6):e0130534.
- Heller J., Ruhnke N., Espino J., Massaroli M., Collado I., Tudzynski P. (2012).** New aspects of the regulatory functions of the MAP kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* during stress and pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11-11-0299.
- Holz G., Coertze S. und Williamson B. (2004).** The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. & Delen N., eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 9-27.
- Jarvis W.R. (1977).** *Botryotinia* and *Botrytis* species. Taxonomy and pathogenicity. Monograph no. 15.
- Jashni M.K., Dols I.H., Lida Y., Boeren S., Beenen H.G., Mehrabi R., Collemare J., de Wit P.J. (2015).** Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. *Molecular Plant Microbe Interactions* 28: 996-1008.
- Johnsson N. und Varshavsky A. (1994).** Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:10340-4.
- Jones J.D.G. und Dangl J. (2006).** The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- Kahmann R. und Kamper J. (2004).** *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* 164:31-42.
- Kabbage M., Williams B., Dickman M.B. (2013).** Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathogens* 9(4):e1003287.
- Kabbage M., Yarden O., Dickman M.B. (2015).** Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. *Plant Science* 233:53-60.
- Kars I., Kroonshof G.H., Wagenmakers L., Joosten R., Benen J.A.E., van Kan J.A.L. (2005).** Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *The Plant Journal* 43:213-225.
- Kato N., Brooks W., Calvo A.M. (2003).** The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA* a gene required for sexual development. *Eukaryotic Cell* 2(6):1178-1186.
- Kim H.S., Han K.Y., Kim K.J., Han D.M., Jahng K.Y., Chae K.S. (2002).** The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 37:72-80.

## Literaturverzeichnis

- Kim K.S., Min J.Y., Dickman M.B. (2008).** Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21: 605-12.
- Kombrink A. und Thomma B.P.H.J. (2013).** LysM Effectors: Secreted Proteins Supporting Fungal Life. *PLoS Pathogens* 9(12):e1003769.
- Könnel A. (2017).** Vergleichende phänotypische, Transkriptom- und Sekretom-Analysen von *Botrytis cinerea* und *Botrytis fabae*. Masterarbeit, AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- Kramer B., Thines E., Foster A.J. (2009).** MAP kinase signalling pathway components and targets conserved between the distantly related plant pathogenic fungi *Mycosphaerella graminicola* and *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* 46:667-681.
- Kunz C., Vandelle E., Rolland S., Poinssot B., Bruel C., Cimerman A., Zotti C., Moreau E., Vedel R., Pugin A., Boccara M. et al. (2006).** Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytologist* 170:537-550.
- Lai Z., Wang F., Zheng Z., Fan B., Chen Z. (2011).** A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal* 66:953-968.
- Lanver D., Mendoza-Mendoza A., Brachmann A., Kahmann R. (2010).** Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* 22:2085-2101.
- Lanver D., Berndt P., Tollot M., Naik V., Vranes M., Warmann T., Münch K., Rössel N., Kahmann R. (2014).** Plant surface cues prime *Ustilago maydis* for biotrophic development. *PLoS Pathogens* 10(7):e1004272.
- Lee S.A., Mao Y., Zhang Z., Wong B. (2001).** Overexpression of a dominant-negative allele of YPT1 inhibits growth and aspartyl protease secretion in *Candida albicans*. *Microbiology* 147(7):1961-70.
- Leroch M., Kleber A., Silva E., Coenen T., Koppenhöfer D., Shmaryahu A., Valenzuela P.D.T., Hahn M. (2013).** Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage. *Eukaryotic Cell* 12(4):614-626.
- Leroch M., Müller N., Hinsenkamp I., Hahn M. (2015).** The signalling mucin Msb2 regulates surface sensing and host penetration via BMP1 MAP kinase signalling in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 16(8):787-798.
- Li B., Wang W., Zong Y., Qin G., Tian S. (2012).** Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* 11:4249-4260.
- Liang X., Liberti D., Li M., Kim Y.T., Hutchens A., Wilson R., Rollins J.A. (2015).** Oxaloacetate acetylhydrolase gene mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* do not accumulate oxalic acid, but do produce limited lesions on host plants. *Molecular Plant Pathology* 16:559-571.
- Líñeiro E., Chiva C., Cantoral J.M., Sabidó E., Fernández-Acero F.J. (2016).** Modifications of fungal membrane proteins profile under pathogenicity induction: A proteomic analysis of *Botrytis cinerea* membranome. *Proteomics* 16(17):2363-76.
- Lipatova Z., Shah A.H., Kim J.J., Mulholland J.W., Segev N. (2013).** Regulation of ER-phagy by a Ypt/Rab GTPase module. *Molecular Biology of the Cell* 24(19):3133-44.
- Liu W., Leroux P., Fillinger S. (2008).** The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidin kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genetics and Biology* 45:1062-1074.
- Liu W., Soulié M.C., Perrino C., Fillinger S. (2011a).** The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. *Fungal Genetics and Biology* 48:377-387.
- Liu W., Zhou X., Li G., Li L., Kong L., Wang C., Zhang H., Xu J. (2011b).** Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation. *PLoS Pathogens* 7(1):e1001261.
- Livak K.J. und Schmittgen T.D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25:402-408.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B. (2014).** The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42:D490-5.
- Lorang J., Kidarsa T., Bradford C.S., Gilbert B., Curtis M., Tzeng S.C., Maier C.S., Wolpert T.J. (2012).** Tricking the guard: exploiting plant defense for disease susceptibility. *Science* 338:659-662.
- Lorang J.M., Sweat T.A., Wolpert T.J. (2007).** Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:14861-14866.

- Love M.**, Huber W., Anders S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15:550.
- Ma Y.**, Qiao J., Liu W., Wan Z., Wang X., Calderone R., Li R. (2008). The *sho1* sensor regulates growth, morphology, and oxidant adaptation in *Aspergillus fumigatus* but is not essential for development of invasive pulmonary aspergillosis. *Infection and Immunity* 76(4):1695-701.
- Maeda T.**, Takekawa M., Saito H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269:554-558.
- Mansfield W.J.** und **Widdowson A.D.** (1973). The metabolism of wyerone acid (a phytoalexin from *Vicia faba* L.) by *Botrytis fabae* and *B. cinerea*. *Physiological Plant Pathology* 3:393-404.
- Manteau S.**, Abouna S., Lambert B., Legendre L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* 43:359-366.
- Marciniszn J.Jr.**, Hartsuck J.A., Tang J. (1976). Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *The journal of biological chemistry* 251(22):7088-7094.
- Mortazavi A.**, Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* 5(7):621-8.
- Mosavi L.K.** Cammett T.J., Desrosiers D.C., Peng Z. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Science* 3(6):1435-1448.
- Mosbach A.**, Leroch M., Mendgen K.W., Hahn M. (2011) Lack of evidence for a role of hydrophobins in conferring surface hydrophobicity to conidia and hyphae of *Botrytis cinerea*. *BMC Microbiology* 11:10.
- Mühlhaus T.**, Weiss,J., Hemme D., Sommer F., Schroda M. (2011). Quantitative shotgun proteomics using a uniform <sup>15</sup>N-labeled standard to monitor proteome dynamics in time course experiments reveals new insights into the heat stress response of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Cell Proteomics* 10(9):M110.004739.
- Müller N.** (2012). Analyse von Protein-Interaktionen bei der Signaltransduktion von *Botrytis cinerea*. Masterarbeit, AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- Nafisi M.**, Stranne M., Zhang L., van Kan J.A., Sakuragi Y. (2014). The endo-arabinanase BcAra1 is a novel host-specific virulence factor of the necrotic fungal phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27:781-792.
- Ni M.** und **Yu J.H.** (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 2(10):e970.
- Niu J.**, Arentshorst M., Nair P.D., Dai Z., Baker S.E., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Punt P.J., Ram A.F. et al. (2015). Identification of a classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: *LaeA* is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites. *G3 (Bethesda)* 6:193-204.
- Nixdorf J.** (2013). Masterarbeit, AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- Noda J.**, Brito N., González C. (2010). The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. *BMC Plant Biology* 10:38.
- Palmer J.M.**, Theisen J. M., Duran R. M., Grayburn W. S., Calvo A. M., Keller, N. P. (2013). Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genetics* 9:e1003193.
- Park H.S.**, Ni M., Jeong K., Kim Y., Yu J.H. (2012). The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 7:e45935.
- Park H.S.**, Nam T.Y., Han K.H., Kim S.C., Yu J.H. (2014). VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 9:e89883.
- Peñalva M.A.**, Tilburn J., Bignell E., Arst H.N. Jr. (2008). Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology* 16:291-300.
- Pérez-Hernández A.**, González M., González C., van Kan J.A., Brito N. (2017). BcSUN1, a *B. cinerea* SUN-Family Protein, is involved in virulence. *Frontiers in Microbiology* 8:35.
- Pérez-Nadales E.** und **Di Pietro A.** (2011). The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 23:1171-1185.
- Pérez-Nadales E.** und **Di Pietro A.** (2015). The transmembrane protein Sho1 cooperates with the mucin Msb2 to regulate invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 16(6):593-603.

- Peter C. (2009).** Morphologische und molekulare Vorgänge bei der Sporenkeimung von *Botrytis cinerea*. Staatsexamensarbeit, AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- Pitoniak A., Birkaya B., Dionne H.M., Vadaie N., Cullen P.J. (2009).** The signaling mucin Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response. *Molecular Cell Biology* 20: 3101-3114.
- Plesken C. (2014).** Vergleichende phylogenetische, populationsgenetische und phänotypische Untersuchungen von *Botrytis* spp.. Dissertation, AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- Plesken C., Westrich L-D., Hahn M. (2014).** Genetic and phenotypic characterization of *Botrytis calthae*. *Plant Pathology* 64(1):128-136.
- Poussereau N., Creton S., Billon-Grand G., Rascal C., Fevre M. (2001).** Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiology* 147:717-726.
- Prins T.W., Tudzynski P., von Tiedmann A., Tudzynski B., ten Have A., Hansen M.E., Tenberge K., van Kan J.A.L. (2000).** Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *Fungal Pathology* pp.33-64.
- Prusky D., Alkan N., Mengiste T., Fluhr R. (2013).** Quiescent and Necrotrophic Lifestyle Choice During Postharvest Disease Development, *Annual Review of Phytopathology* 51:155-176. Review.
- Prusky D., Bi F., Moral J., Barad S. (2016).** How does host carbon concentration modulate the lifestyle of postharvest pathogens during colonization? *Frontiers in Plant Science* 7:1306.
- Prusky D., McEvoy J.L., Saftner R., Conway W.S., Jones R. (2004).** Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology* 94:44-51.
- Purschwitz J., Müller S., Fischer R. (2009).** Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Molecular Genetics and Genomics* 281:35-42.
- Rolke Y., Liu S., Quidde T., Williamson B., Schouten A., Weltring K.M., Siewers V., Tenberge K.B., Tudzynski B., Tudzynski P. (2004).** Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BcSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BcGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* 5:17-27.
- Rolland S.G. und Bruel C.A. (2008).** Sulfur and nitrogen regulation of the protease-encoding ACP1 gene in the fungus *Botrytis cinerea*: correlation with a phospholipase D activity. *Microbiology* 154:1464-1473.
- Rolland S.G., Bruel C., Rasclé C., Girard V., Billon-Grand G., Poussereau N. (2009).** pH controls both transcription and posttranslational processing of the protease BcACP1 in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Microbiology* 155:2097-2105.
- Román E., Nombela C., Pla J. (2005).** The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Cell Biology* 25:10611-10627.
- Rui O. und Hahn M. (2007).** The Slit2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and hist tissue colonization. *Molecular Plant Pathology* 8:173-184.
- Ruijter G.J.G., van de Vondervoort P.J.I., Visser J. (1999).** Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH5 and in the presence of manganese. *Microbiology* 145:2569-76.
- Rupp S., Weber R.W., Detzel P., Rieger D. and Hahn M. (2017).** Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Frontiers in Microbiology* 7:2075.
- Saloheimo M., Wang H., Valkonen M., Vasara T., Huuskonen A., Riikonen M., Pakula T., Ward M., Penttilä M. (2004).** Characterization of secretory genes *ypt1/yptA* and *nsf1/nsfA* from two filamentous fungi: Induction of secretory pathway genes of *Trichoderma reesei* under secretion stress conditions. *Applied Environmental Microbiology* 70(1):459-67.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (2001).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardiña, J.R. (1929).** Una nueva especie de *Botrytis* que ataca a las habas. *De Historia Naturalis* 291-294.
- Sarikaya-Bayram Ö., Bayram Ö., Valerius O., Park H.S., Irrniger S., Gerke J., Ni M., Han K.H., Yu J.H., Braus G.H. (2010).** LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genetics* 6(12):e1001226.



- Sarikaya-Bayram** Ö., Bayram Ö., Feussner K., Kim J.-H., Kim H.-S., Kaefer A., Feussner I., Chae K.-S., Han D.-M., Han K.-H., Braus G. H. (2014). Membrane-bound methyltransferase complex VapA-VipC-VapB guides epigenetic control of fungal development. *Developmental Cell* 29:406-420.
- Sarikaya-Bayram** Ö., Palmer J.M., Keller N., Braus G.H., Bayram Ö. (2015). One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Frontiers in Microbiology* 6:1-7. Review.
- Saudek V.** (2012). Cystinosin, MPDU1, SWEETs and KDELR belong to a well-defined protein family with putative function of cargo receptors involved in vesicle trafficking. *PLoS One* 7(2):e30876.
- Schaeffer H.J.**, und **Webber M.J.** (1999). Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular Cell Biology* 19:2435-2444.
- Schamber A.**, Leroch M., Diwo J., Mendgen, Hahn M. (2010). The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 11(1):105-119.
- Schouten A.**, van Baarlen P., van Kan J.A.L. (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol* 177:493-505.
- Schumacher J.**, Gautier A., Morgant G., Studt L., Ducrot P.H., Le Pêcheur P., Azeddine S., Fillinger S., Leroux P., Tudzynski B., Viaud M. (2013). A functional bikaverin biosynthesis gene cluster in rare strains of *Botrytis cinerea* is positively controlled by VELVET. *PLoS One* 8:e53729.
- Schumacher J.**, Pradier J.M., Simon A., Traeger S., Moraga J., Collado I. G., Viaud M., Tudzynski B. (2012). Natural variation in the VELVET gene *bcvel1* affects virulence and lightdependent differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 7(10):e47840.
- Schumacher J.**, Simon A., Cohrs K. C., Traeger S., Porquier A., Dalmais B., Viaud M., Tudzynski B. (2015). The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism, and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(6):659-674.
- Schumacher J.** (2016a). Signal transduction cascades regulating differentiation and virulence in *Botrytis cinerea*. In: Fillinger S., Elad Y. (eds), *Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer, Switzerland 247-267.
- Schumacher J.** (2016b). DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes. *Molecular Microbiology* 99:729-748.
- Seiboth B.**, Karimi R.A., Phatale P.A., Linke R., Hartl L., Sauer D.G., Smith K.M., Baker S.E., Freitag M., Kubicek C.P. (2012). The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology* 84:1150-1164.
- Segmüller N.**, Ellendorf U., Tudzynski B., Tudzynski P. (2007). BcSak1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic Cell* 6:211-221.
- Shah P.**, Atwood J.A.III, Orlando R., El Mubarek H., Podila G.K., Davis M. (2009b). Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *Journal of Proteome Research* 8:1123-1130.
- Shah P.**, Gutierrez-Sanchez G., Orlando R., Bergmann C. (2009a). A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics* 9:3126-313575.
- Shah P.**, Powell A.L.T., Orlando R., Bergmann C., Gutierrez-Sanchez G. (2012). Proteomic analysis of ripening tomato fruit infected by *Botrytis cinerea*. *Journal of Proteome Research* 11:2178-2192.
- Shamraychuk I.L.**, Yakov E. Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Belyakova G.A. (2014). Extracellular proteases of *Botrytis cinerea* and peculiarities of their secretion. *International Scientific Journal Medical and Biological Sciences*, Vol.2.
- Shlezinger N.**, Minz A., Gur Y., Hatam I., Dagdas Y.F., Talbot N.J. (2011). Anti-Apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS Pathogens* 7:e1002185.
- Siriputthaiwan P.**, Jauneau A., Herbert C., Garcin D., Dumas B. (2005). Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Cell Science* 118(Pt2):323-9.
- Staats M.**, van Baarlen P., Schouten A., van Kan J.A.L. (2007). Functional analysis of NLP genes from *Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology* 8(2):209-214.
- Staats M.**, van Baarlen P., van Kan J.A.L. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2):333-346.

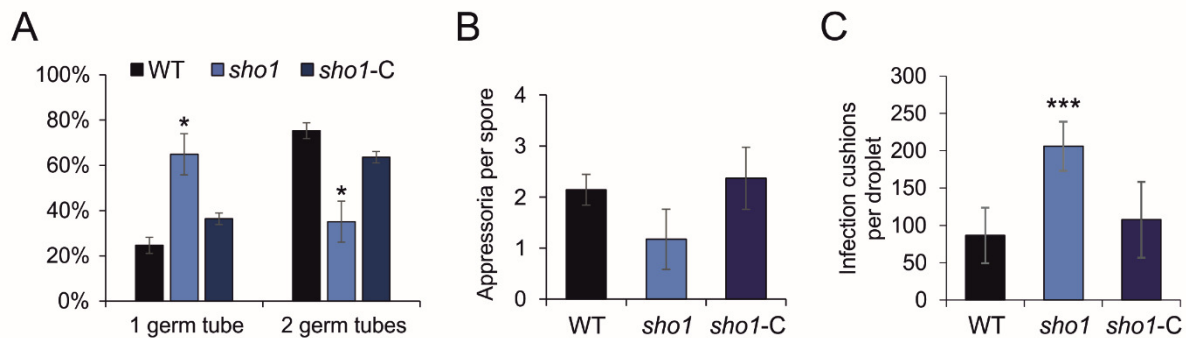
- Staats M. und van Kan J.A.L. (2012).** Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryotic Cell* 11(11):1413-4.
- Stefanato F.L., Abou-Mansour E., Buchala A., Kretschmer M., Mosbach A., Hahn M., Bochet C.G., Métraux J.P., Schoonbeek H. (2009).** The ABC transporter *BcatrB* from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 58:499-510.
- Stephenson K. (2015).** Analyse art- und stammspezifischer Gene sowie putativer Virulenzfaktoren bei *Botrytis*. AG Phytopathologie, TU Kaiserslautern.
- Stinnett S., Espeso E., Cobeño L., Araújo-Bazán L., Calvo A. (2007).** *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Molecular Microbiology* 63(1):242-55.
- Taiz L. und Zeiger E. (2007).** *Plant Physiology*. 4. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-8274-1865-4.
- Takano Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J.E., Mise, K., Furusawa I. (2000).** The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13:374-383.
- ten Have A., Mulder W., Visser J., van Kan J. (1998).** The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11:1009-1016.
- ten Have A., Dekkers E., Kay J., Phylip L.H., van Kan, J.A.L. (2004).** An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. *Microbiology* 150:2475-2489.
- ten Have A., Espino J.J., Dekkers E., Van Sluyter S.C., Brito N., Kay J. (2010).** The *Botrytis cinerea* aspartic proteinase family. *Fungal Genetics and Biology* 47:53-65.
- Tenberge K.B. (2007).** Morphology and Cellular Organisation in *Botrytis* Interactions with Plants. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N., eds. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers 67-84.
- Thoms S. und Schurig J. (2016).** The secretome of *Botrytis cinerea* wild-type and mutant strains *in vitro* and *on planta*. Masterarbeit. AG Phytopathologie TU Kaiserslautern.
- Vadaie N., Dionne H., Akajagbor D.S., Nickerson S.R., Krysan D.J., Cullen P. (2008).** Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *Cell Biology* 181(7):1073-1081.
- van Kan J.A.L. (2005).** Infection strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae* 669:77-90.
- van Kan J.A.L. (2006).** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11:247-253.
- van Kan J.A., Stassen J.H., Mosbach A., van der Lee T.A., Faino L., Farmer A.D., Papatotiriou D.G., Zhou S., Seidl M.F., Cottam E., Edel D., Hahn M., Schwartz D.C., Dietrich R.A., Widdison S., Scalliet G. (2017).** A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 18:75-89.
- Verhoeff K., Leeman M., van Peer R. Posthuma, L., Schot N., van Eijk G.W. (1988).** Changes in pH and the production of organic acids during colonisation of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 122:327-336.
- Watson J.D., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. (2011).** *Molekularbiologie*. 6. Auflage. Pearson Studium, München.
- Webster J. und Weber R.W.S. (2007).** *Introduction to Fungi*. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, Sao Paulo: Cambridge University Press.
- Wessel D. und Flügge U.I. (1984).** A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138:141-143.
- Williams B., Kabbage M., Kim H.J., Britt R., Dickman M.B. (2011).** Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens* 7:e1002107.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., van Kan J.A.L. (2007).** Pathogen profile *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8:561-680.
- Wong S.H. und Dumas B. (2010).** Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryotic Cell* 9(4):480-5.

## Literaturverzeichnis

- Wu J.**, Wang Y., Park S., Kim S.G., Yoo J.S., Park S., Gupta R., Kang K., Kim S.T. (2016). Secreted alpha-N-Arabinofuranosidase B protein is required for the full virulence of *Magnaporthe oryzae* and triggers host defences. PLoS One 11(10):e0165149.
- Xu J.R.** (2000). MAP Kinases in Fungal Pathogens. Fungal Genetics and Biology 31:137-152.
- Xu L.**, Xiang M., White D., Chen W. (2015). pH Dependency of sclerotial development and pathogenicity revealed by using genetically defined oxalate-minus mutants of *Sclerotinia sclerotiorum*. Environmental Microbiology 17:2896-2909.
- Yang Q.**, Chen Y., Ma Z. (2012). Involvement of BcVeA and BcVeB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. Fungal Genetics and Biology 50:63-71.
- Zhang H.**, Xue C., Kong .L, Li G., Xu J.R. (2011). A Pmk1-interacting gene is involved in appressorium differentiation and plant infection in *Magnaporthe oryzae*. Eukaryot Cell 10:1062-1070.
- Zhang J.**, Wu M.D., Li G.-Q., Yang L., Yu L., Jiang D.-H., Huang H.-C., Zhuang W.-Y. (2010). *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. Mycologia 102:1114-1126.
- Zhang Z.**, Qin G., Li B., Tian S. (2014). Knocking out *Bcsas1* in *Botrytis cinerea* impacts growth, development, and secretion of extracellular proteins, which decreases virulence. Molecular Plant Microbe Interaction 27(6):590-600.
- Zhang Y.**, Zhang Y., Qiu D., Zeng H., Guo L., Yang X. (2015). *BcGs1*, a glycoprotein from *Botrytis cinerea*, elicits defence response and improves disease resistance in host plants. Biochemical and Biophysical Research Communications 457:627-634.
- Zhao X.**, Kim Y., Park G., Xu J.R. (2005). A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Regulating Infection-Related Morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. The Plant Cell 17:1317-1329.
- Zhao X.**, Mehrabi R., Xu, J.R. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. Eukaryotic Cell 6:1701-1714.
- Zhao X.** und **Xu J.R.** (2007). A highly conserved MAPK-docking site in Mst7 is essential for Pmk1 activation in *Magnaporthe grisea*. Molecular Microbiology 63(3):881-894.
- Zheng L.**, Campbell M., Murphy J., Lam S., Xu J.R. (2000). The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Microbe Interactions 13(7):724-732.
- Zhu W.**, Ronen M., Gur Y., Minz-Dub A., Masrati G., Ben-Tal N., Sharon I., Savidor A., Eizner E., Valerius O., Braus G., Bowler K., Bar-Peled M., Sharon A. (2017). *BcXYG1*, a secreted xyloglucanase from *Botrytis cinerea* induces cell death and triggers plant defense. Plant Physiology 175(1):438-456.

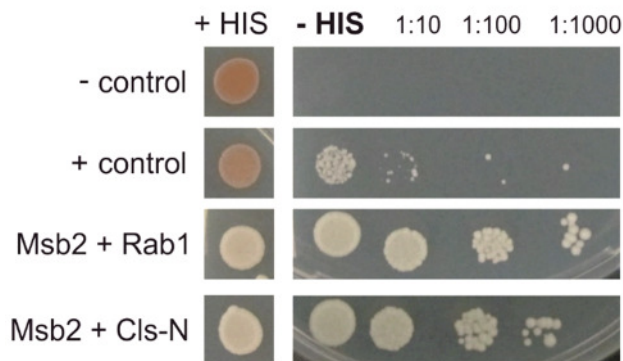
## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungen



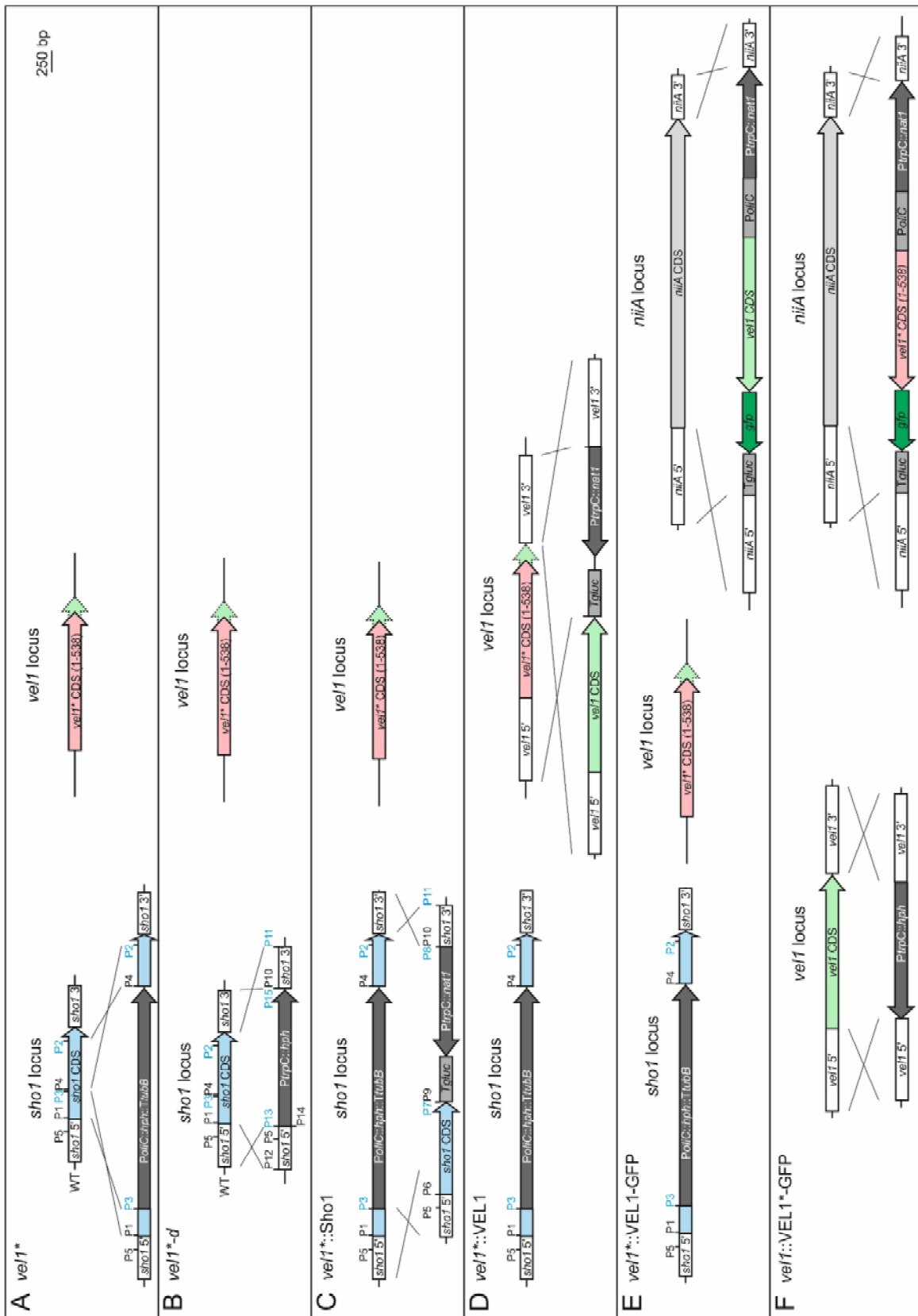
**Abb. Anhang 1: Differenzierung von Keimschläuchen im Vergleich zwischen Wildtyp und *sho1* Mutante, sowie der *sho1* Komplementante.**

(A) Anzahl der Keimschläuche nach 18 h. (B) Anzahl der gebildeten Appressorien pro gekeimter Spore nach 18 h. (C) Anzahl der Infection cushions nach 48 h. Die Inokulation auf Glas erfolgte mit 25  $\mu$ l Tropfen mit  $1 \times 10^5$  Sporen/ml in Gamborg-Minimalmedium mit 25 mM Glucose. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind gekennzeichnet ( $p < 0.05$ :\*;  $p < 0.001$ :\*\*\*).



**Abb. Anhang 2: Verifizierung zweier mit Msb2 interagierenden Proteine mittels Yeast two-hybrid Analyse.**

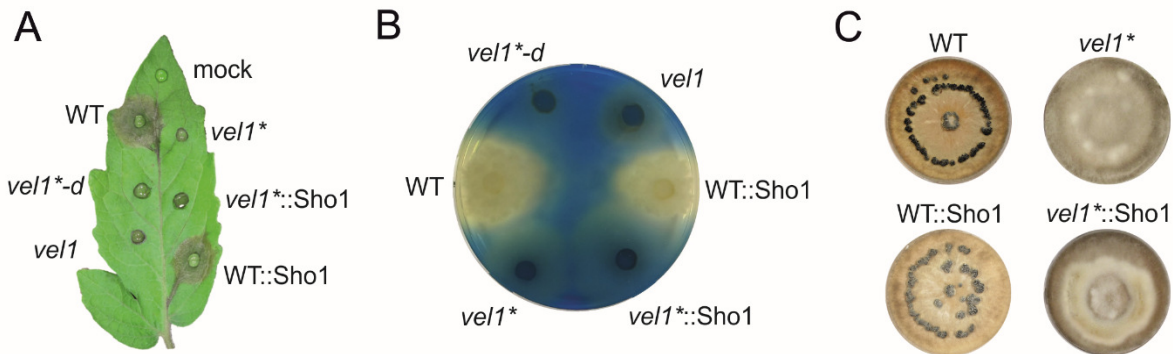
Hefetransformanten mit dem Bait-Konstrukt pDHB1\_Msb2-CT und dem Prey-Konstrukt pPR3N-Rab1 (Rab1-GTPase) bzw. pPR3N-Clis-N (Cardiolipin Synthase ähnlich) wurden als Wachstumskontrolle in unterschiedlichen Verdünnungen auf SC-Platten (+HIS) getropft. Das Wachstum auf Histidin-freiem Agar (-HIS) beweist die Interaktion durch die *his3* Reporter-gen-Aktivität.



**Abb. Anhang 3: Konstruktion verschiedener *vel1\** Mutanten und Komplementationsstämme.**

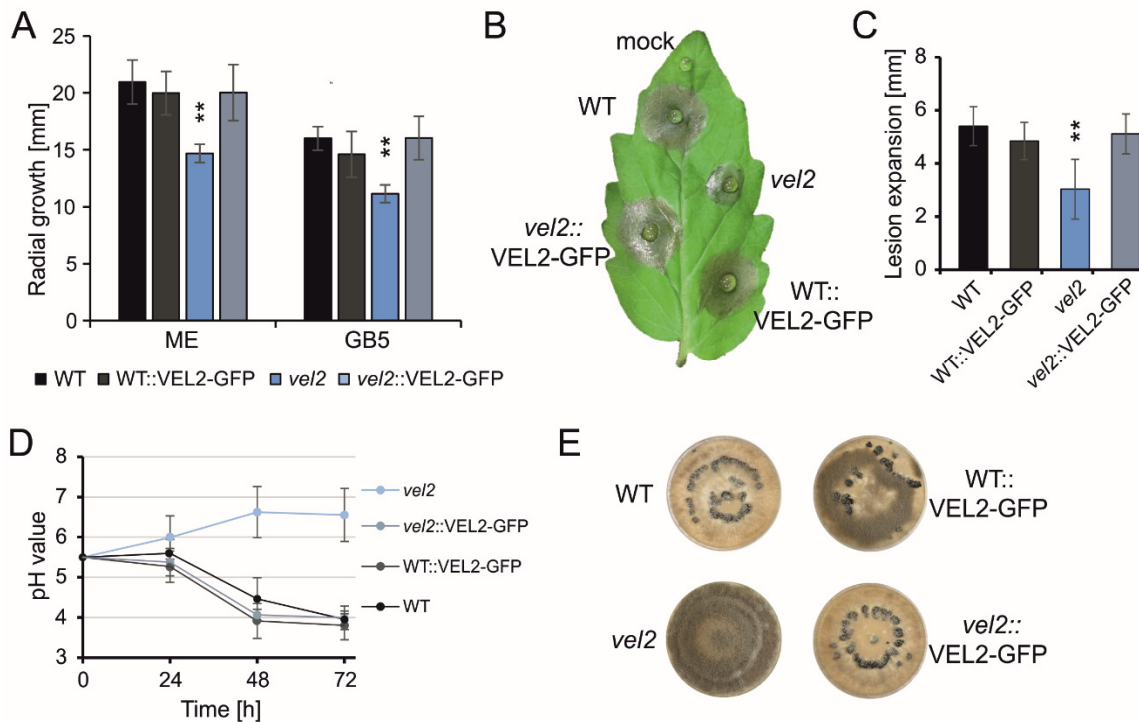
(A) Die *vel1\** Mutante enthält eine in die für *sho1* codierende Sequenz integrierte Hygromycin-Resistenzkassette (*PolIC-hph-TubB*). Das Gen *vel1* trägt die zufällig entstandene (*vel1\**) Punktmutation 1615 C→T. (B) In der Mutante *vel1\*-d* ist zusätzlich zur *vel1\** Mutation die für *sho1* codierende Sequenz vollständig durch die Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette deletiert. (C) Im Stamm *vel1\*::Sho1* ist das defekte *sho1* Gen *in loco* durch eine intakte Kopie von

*sho1* zusammen mit einer Nourseothricin-Resistenzkassette (*P<sub>trpC</sub>-nat1-Tgluc*) ersetzt. **(D)** Im Stamm *vel1\*::VEL1* wurde in der *vel1\**-Mutante das mutierte Gen *vel1\** *in loco* durch das intakte *vel1* Gen zusammen mit einer Nourseothricin-Resistenzkassette (*P<sub>trpC</sub>-nat1-Tgluc*) ersetzt. **(E)** Die Integration des in Schumacher *et al.*, (2012) beschriebenen VEL1-GFP Konstrukts in den *niiA* Lokus der *vel1\** Mutante resultiert im Stamm *vel1\*::VEL1-GFP*. **(F)** In Stamm *vel1\*::VEL1-GFP* wurde in den *niiA* Lokus der *vel1* Mutante ein Konstrukt integriert, welches für ein mit GFP fusioniertes verkürztes VEL1<sup>1-538</sup> kodiert. Primerbindestellen sind markiert (P1-13), am komplementären Strang bindende Primer sind in blauer Schrift dargestellt.



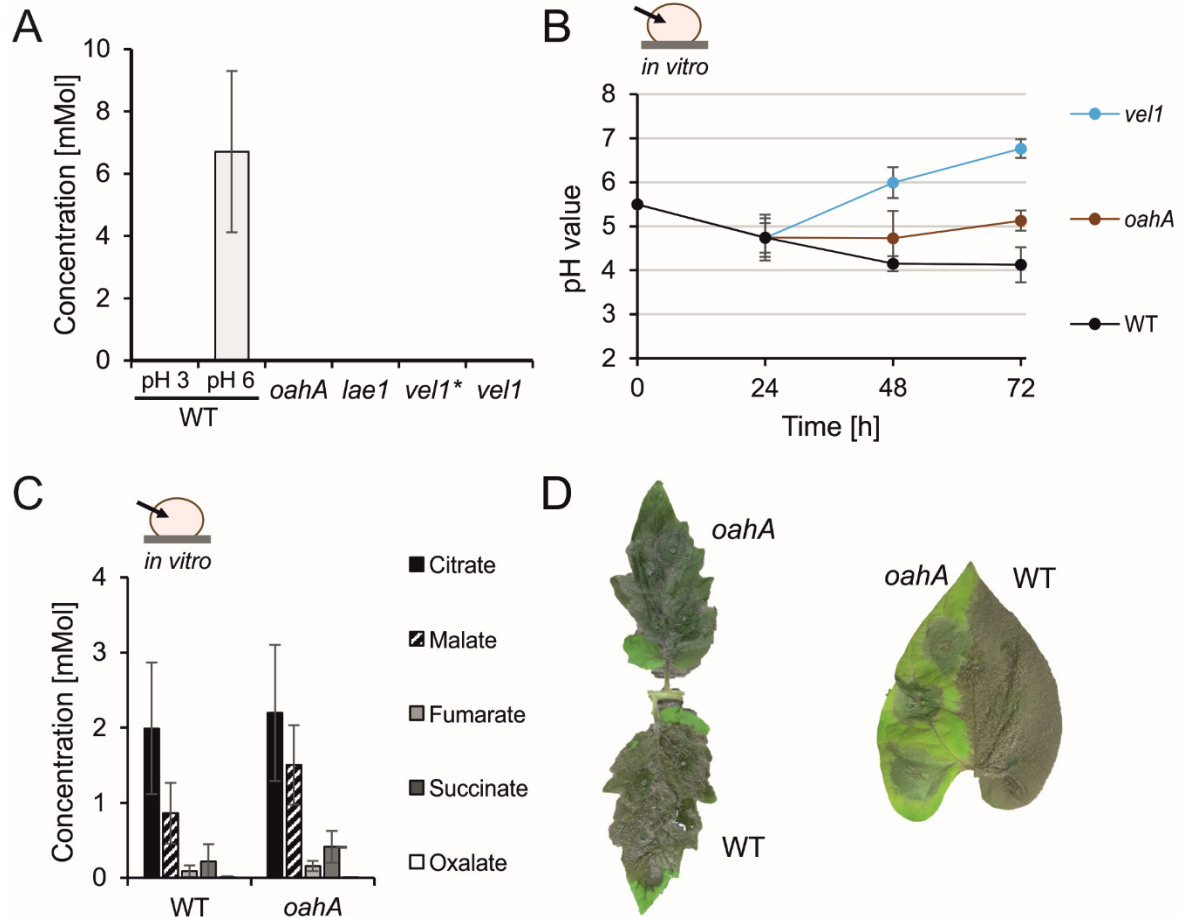
**Abb. Anhang 4: Die *sho1* Komplementation in der *vel1\** Mutante.**

Gezeigt sind phänotypische Analysen im Vergleich zum *B. cinerea* Wildtyp (WT). Es werden verschiedene Mutanten und Stämme, welche ein Sho1 Komplementationskonstrukt *in loco* integriert haben. **(A)** Läsionsbildung auf Tomatenblättern (72 h). **(B)** pH-Modulation auf Agarplatten visualisiert durch den pH-Indikator Bromthymolblau (5 Tage). **(C)** Skerotieninduktionstest auf Malzextrakt-Agar nach vier Wochen im Dunkeln bei 15 °C.



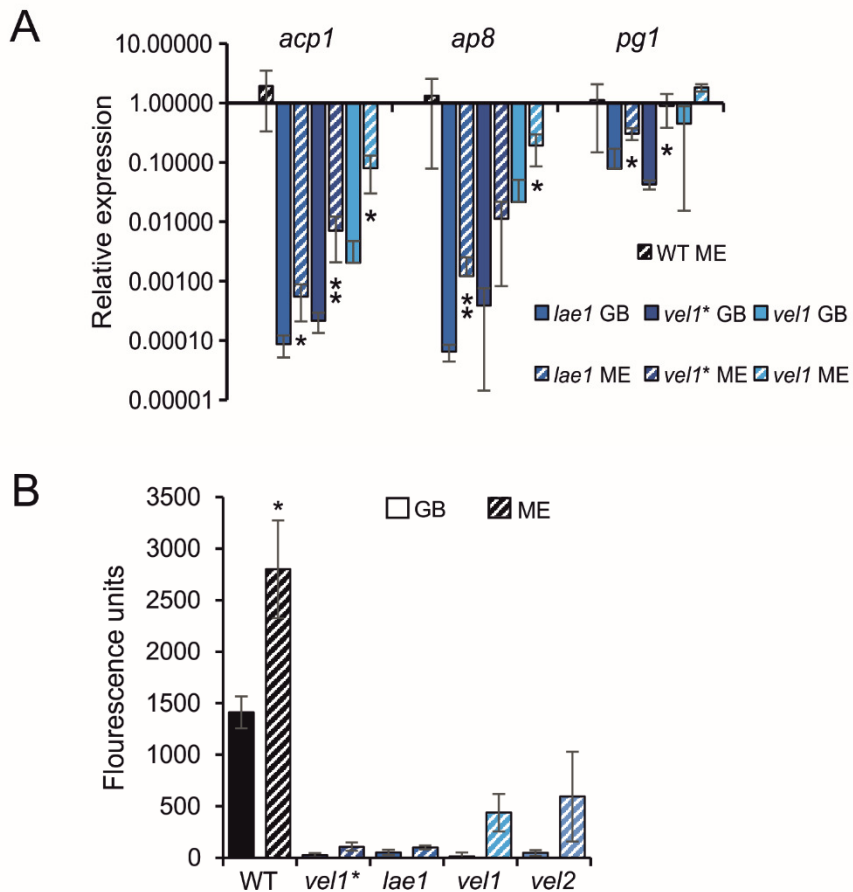
**Abb. Anhang 5: Komplementation des *vel2* Deletionsphänotyps mittels Integration von VEL2-GFP.**

**(A)** Vegetatives Wachstum von *B. cinerea* Wildtyp und Mutanten auf Malzextrakt-Vollmedium (ME) und Gamborg Minimalmedium mit 5 mM Glucose (GB5) **(B)** Läsionsbildung und **(C)** Radiale Läsionsausbreitung auf Tomatenblättern (72 h) **(D)** pH-Verlauf während der Infektion **(E)** Bildung von Sklerotien. Signifikante Abweichungen in (A) und (B) im Vergleich zum Wildtyp sind gekennzeichnet ( $p < 0,01$ :\*\*).



**Abb. Anhang 6: Sekretion organischer Säuren *in vitro* durch *B. cinerea* Wildtyp (WT) und Mutanten, und *oahA* Phänotyp im späten Infektionsstadium.**

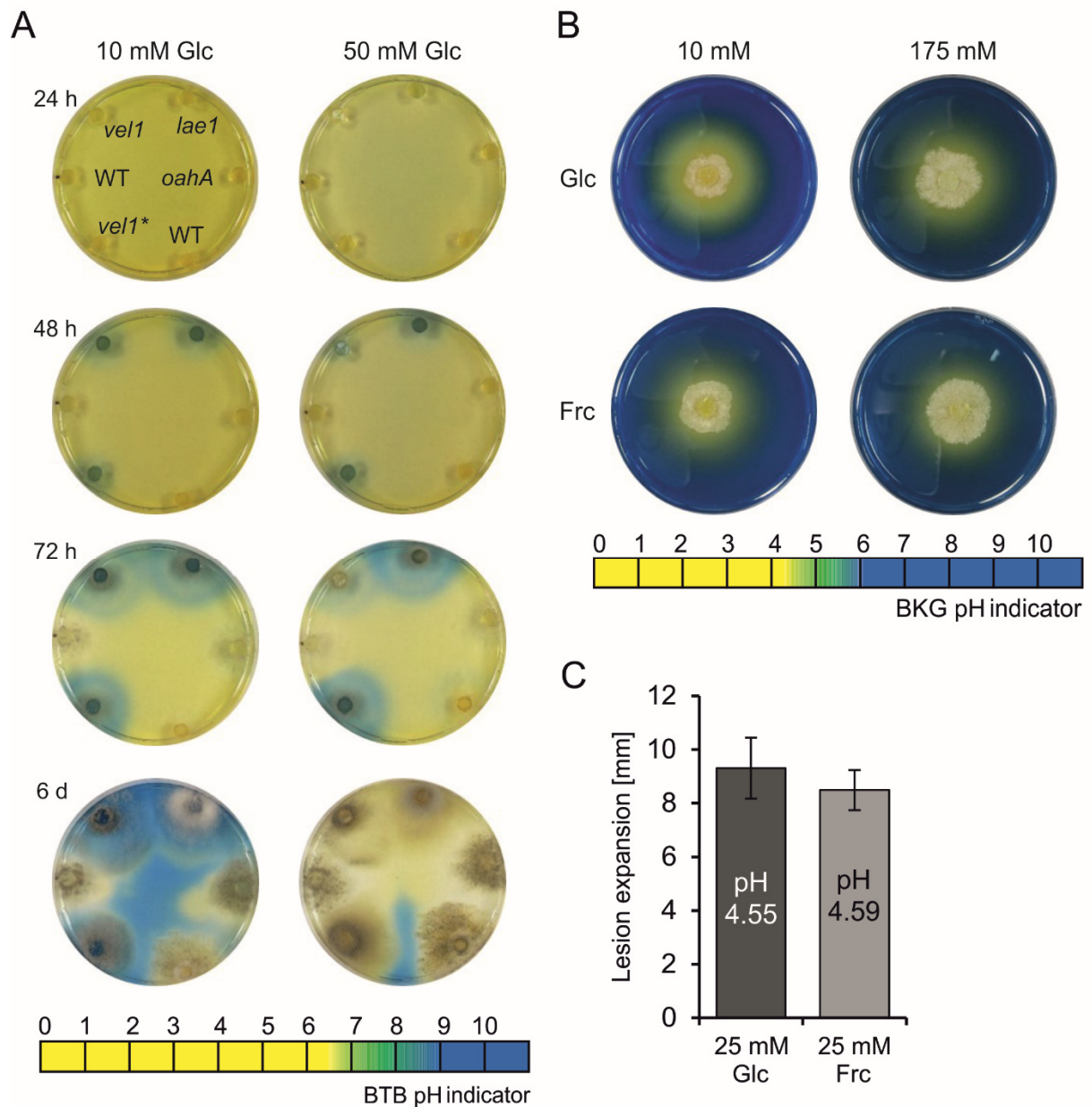
(A) Sekretion von Oxalat nach 7 Tagen in Flüssigmedium auf pH 3 (nur WT) bzw. pH 6 (WT und Mutanten) eingestellt. (B) pH-Verlauf *in vitro* (48 h) nach Inokulation von Tropfen ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) auf künstlicher Oberfläche. (C) Sekretion organischer Säuren *in vitro* (48 h) nach Inokulation von Tropfen ( $1 \times 10^5$  Sporen/ml) auf künstlicher Oberfläche (D) Nekrotische Tomatenblätter (7 Tage, links) und *Phaseolus* (5 Tage, rechts), infiziert mit WT und *oahA*.



**Abb. Anhang 7: Einfluss von Vollmedium auf die Expression Virulenz-assoziiierter Gene und Proteaseaktivität während der Infektion durch *B. cinerea* Wildtyp (WT) und Mutanten.**

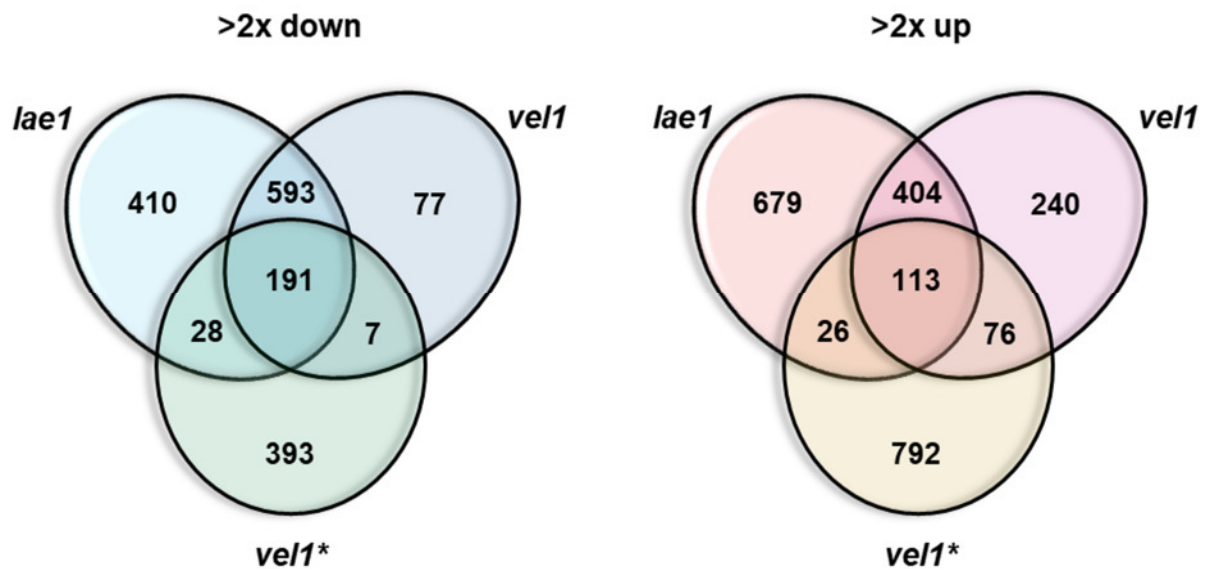
**(A)** Relative Expression (qRT-PCR) während der Infektion von Tomatenblättern (48 h). Alle Werte sind im Vergleich zum WT in Minimalmedium dargestellt. **(B)** Relative Proteaseaktivitäten der *on planta* Exudate (48 h) sind als Fluoreszenzintensität dargestellt, welche die Proteolyse des Substrats anzeigt. Es werden jeweils die Inokulation der Sporen in Minimal- (GB) und Vollmedium (ME) miteinander verglichen. Signifikante Abweichungen im Vergleich der Inokulationsmedien sind gekennzeichnet ( $p < 0,05$ :\*;  $p < 0,01$ :\*\*).





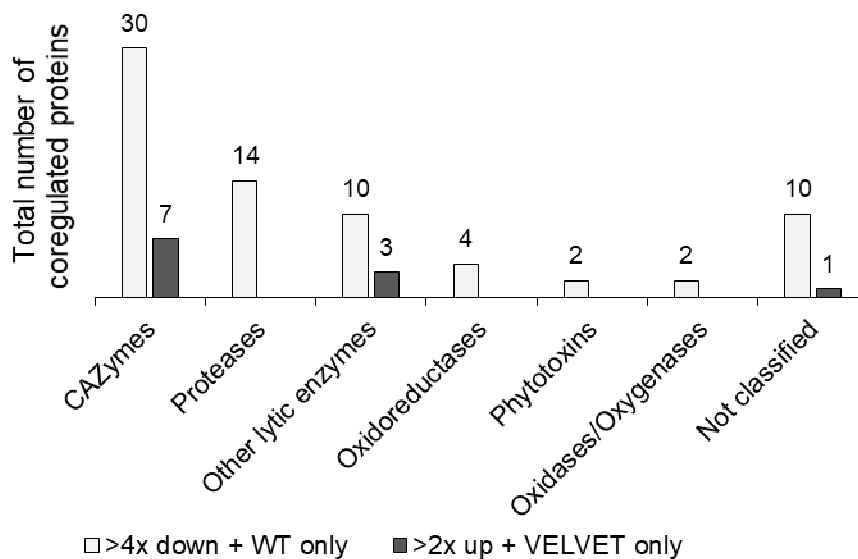
**Abb. Anhang 8: Vergleich des Einflusses verschiedener Hexosen auf Azidifizierung und Infektion.**

**(A)** pH-Verlauf des *B. cinerea* Wildtyps (WT) und verschiedener Mutanten auf Bromthymolblau (BTB)-Indikatorplatten unterschiedlicher Glucose-Konzentrationen **(B)** pH-Verlauf des WT auf Bromkresolgrün (BKG)-Indikatorplatten im Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen Glucose (Glc) und Fructose (Frc) 72 h **(C)** Radiale Läsionsausbreitung des WT und pH-Wert im Vergleich zwischen Inokulation mit Glc und Frc 72 h auf Tomatenblättern.



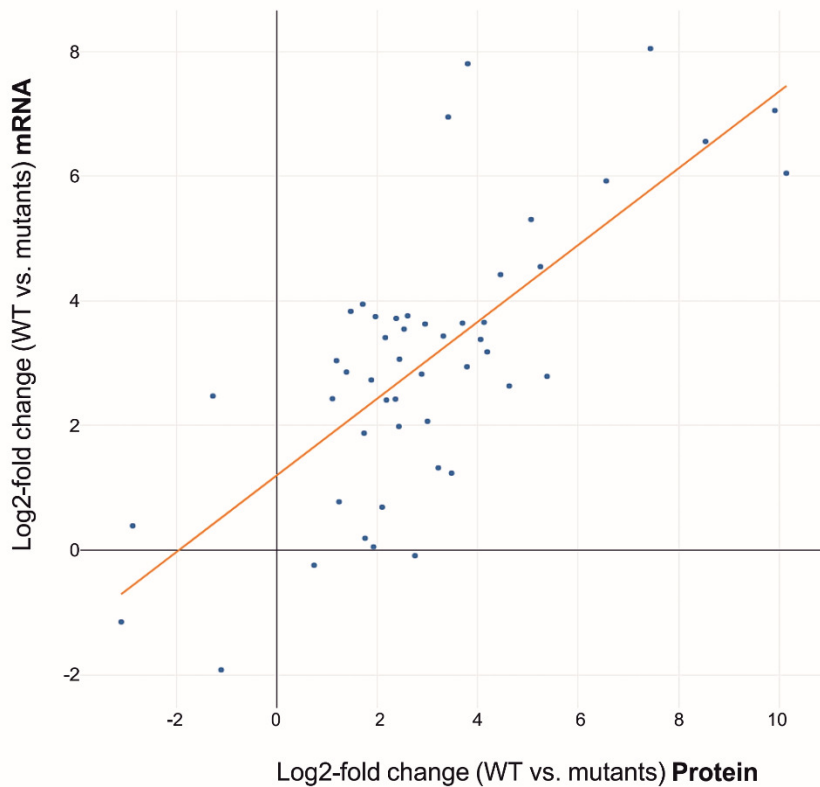
**Abb. Anhang 9: Koregulation der in VELVET-Mutanten differenziell exprimierten Gene.**

Die RNAseq-basierten Datensätze der in *vel1\**, *lae1* und *vel1* im Vergleich zum *B. cinerea* Wildtyp differenziell exprimierten Gene wurden zwischen den Mutanten verglichen und die Anzahl koregulierter Gene ermittelt.



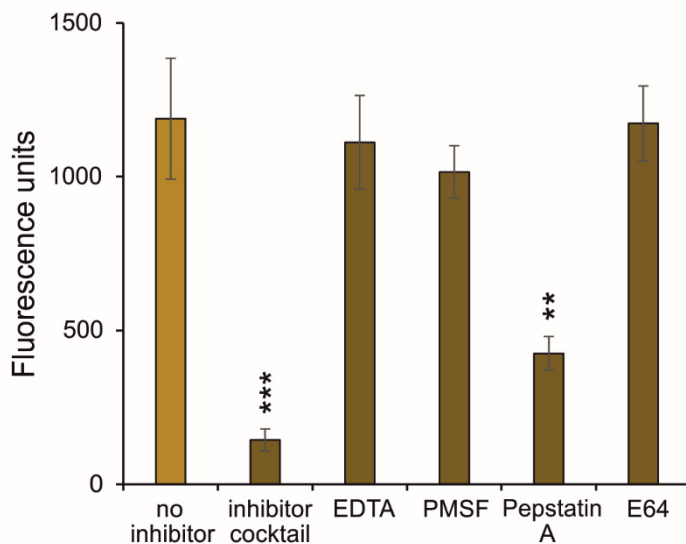
**Abb. Anhang 10: Klassifizierung der in VELVET-Mutanten differentiell sekretierten Proteine.**

Dargestellt sind über- und unterrepräsentierte funktionelle Gruppen im Vergleich der *on planta* Sekretome (48 h) zwischen Wildtyp und den beiden VELVET-Mutanten *vel1\** und *lae1*. Die differenzielle Regulation der CAZymes und Proteasen waren im Z-Test angereichert (enrichment).



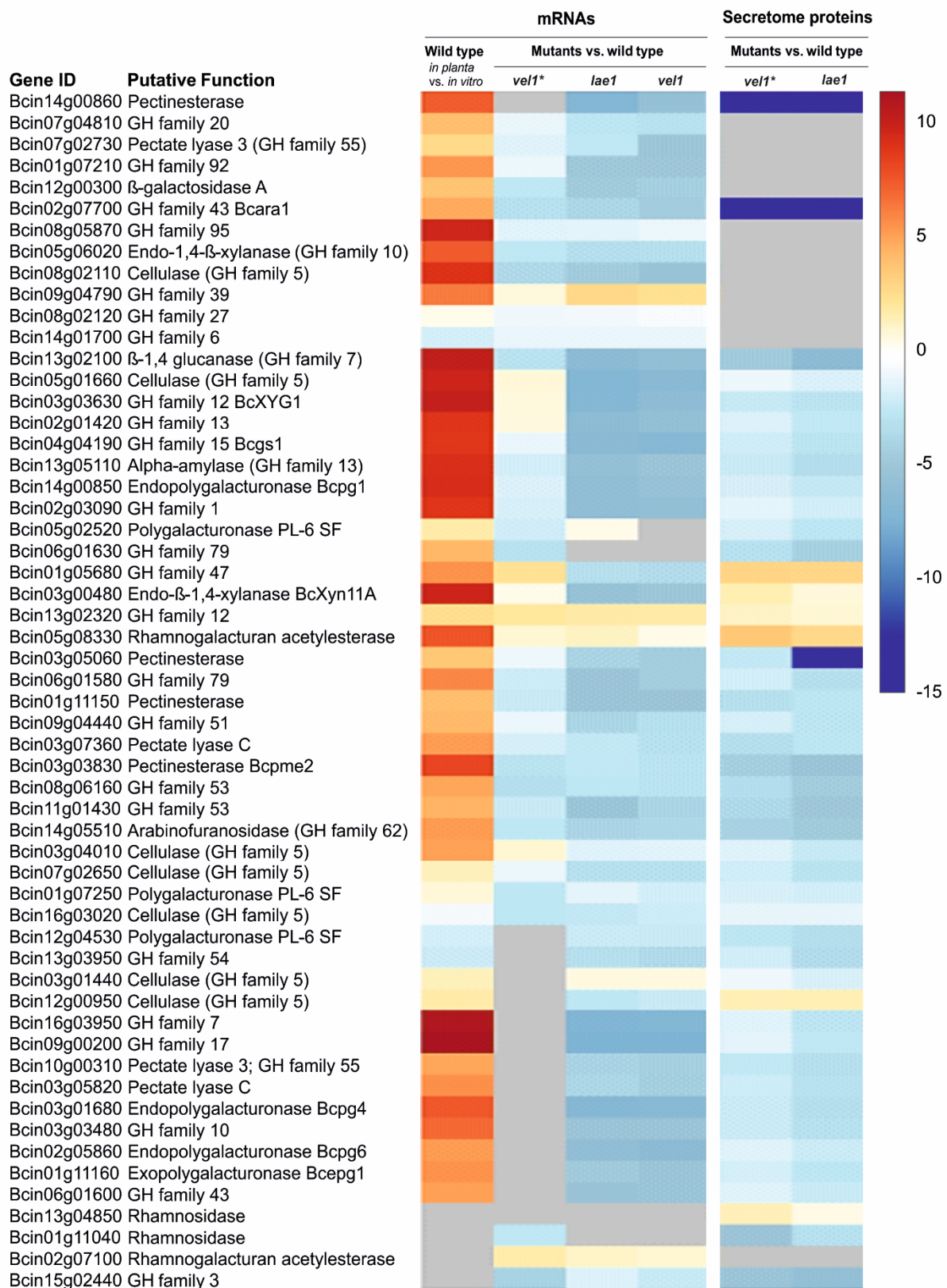
**Abb. Anhang 11: Korrelation von mRNA- und Protein-Level der Expressionsunterschiede sekretierter Proteine im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und VELVET-Mutanten.**

Es ergibt sich im Vergleich zwischen WT und den jeweils vereinigten Daten der VELVET-Mutanten *vel1\** und *lae1* ein Korrelationskoeffizient von  $r^2=0,534$ . Erstellt von D. Zimmer.



**Abb. Anhang 12: Inhibierung der Proteaseaktivität des *B. cinerea* on *planta* Exudats von Tomate.**

Relative Proteaseaktivitäten der Messung bei pH 3 sind als Fluoreszenzintensität dargestellt, welche die Proteolyse des Substrats anzeigt. Proteaseinhibitoren: EDTA (10 mM), PMSF (1 mM), Pepstain A (10  $\mu$ M) und E 64 (10  $\mu$ M), und eines Inhibitor-Cocktails (2  $\mu$ l/ml). Signifikante Abweichungen sind gekennzeichnet ( $p < 0,01$ :\*\*,  $p < 0,001$ :\*\*\*).



**Abb. Anhang 13: In VELVET-Mutanten koreguliert sekretierte CAZymes.**

Farbig dargestellt ist die differenzielle Expression aller sekretierten *B. cinerea* CAZymes in x-facher Expressionsänderung, welche eine Koregulation in VELVET-Mutanten entweder auf mRNA-Level und/oder in der quantitativen Sekretom-Analyse zeigten. Zusätzlich ist in der Spalte links die differenzielle Expression im Wildtyp *in vitro* im Vergleich zu *in planta* (24 h) Bedingungen gezeigt. Das hierarchische Clustering und die Darstellung als Heatmap wurde durch D. Zimmer erstellt. Transkriptomdaten wurden mithilfe der DESeq2-Analyse ausgewertet.

## 8.2 Tabellen

**Tab. Anhang 1: Keimungsregulierung und *in planta* Expression der zur Analyse der BMP1-MAPK-Kaskade deletierten Gene.**

Die Microarray-Analyse während der Keimungsstadien ist relativ zum Wildtyp (WT) nach 0 h dargestellt (Werte aus Leroch *et al.*, 2013). Eine *in planta* Induktion ist gegeben, wenn die Expression des entsprechenden Gens in der RNAseq-Analyse des Wildtyps *in planta* (24 h) >2x höher ist als *in vitro* (32 h).

Name	Microarray analysis							Expression <i>in planta</i> (RPKM)	>2x <i>in planta</i> induced
	WT 0 h	WT 1 h	WT 2.5 h	WT 4 h	WT 15 h	<i>bmp1</i> 3.5 h	<i>msb2</i> 3 h		
<i>bic5</i>	1	6,9	4,2	3,2	3,3	3,9	5,3	>40	no
<i>bic8</i>	1	3,8	9,9	5,2	1,5	5,8	12,9	>20	no
<i>plc1</i>	1	23,5	32,8	33,3	3,3	0,9	14,6	>400	yes
<i>cel1</i>	1	7,0	5,4	3,6	2,1	0,4	2,2	>500	yes
<i>af1</i>	1	12,4	5,8	3,1	0,8	0,3	0,7	>100	yes
<i>lpl1</i>	1	37,5	6,5	2,8	1,6	2,3	5,0	no	no
<i>cda1</i>	1	104,8	69,4	44,7	3,8	2,7	34,4	no	no
<i>gis1</i>	1	40,2	42,8	18,4	5,7	0,6	5,6	>30	yes
<i>gis2</i>	1	4,5	18,6	28,3	2,2	0,9	21,7	<10	no
<i>gis3</i>	1	1,0	10,7	14,7	13,1	0,5	0,4	no	no
<i>gic1</i>	1	8,3	3,7	1,9	0,5	0,3	0,2	>40	yes
<i>gic2</i>	1	8,1	16,3	6,3	2,0	1,3	1,6	>170	yes
<i>gim1</i>	1	4,3	12,0	9,9	4,9	0,7	1,2	no	no
<i>arp1</i>	1	2,2	1,7	1,5	0,2	0,0	0,0	>75	no

**Tab. Anhang 2: Enrichment-Analyse funktioneller Klassen der differenziell in den VELVET-Mutanten *lae1*, *vel1\** und *vel1* koregulierten Gene.**

Sekretierte Proteine sind als separate Gruppe dargestellt, welche teilweise mit anderen Klassen Schnittmengen bildet. Die im Z-Test signifikante ( $p < 0,01$ ) Anreicherung (rot) oder Unterrepräsentation (blau) einer Klasse im Vergleich zu allen exprimierten Genen derselben ist farbig markiert ( $p\text{-value} < 0,01$ ).

	Gene expression		Enrichment analysis	
	Total no. genes expressed in WT	>2-fold change VELVET vs. WT	expected	observed
<b>Secreted</b>	681	105	9.0%	<b>34.5%</b>
<b>Not classified secreted</b>	402	41	4.9%	<b>12.5%</b>
CAZymes	283	42	3.7%	<b>13.8%</b>
Proteases	181	27	2.3%	<b>8.9%</b>
Primary metabolism	1040	20	13.2%	<b>6.6%</b>
Stress response and detoxification	155	7	2.0%	2.3%
Transporters	268	29	3.6%	<b>9.5%</b>
Cyt P450	63	4	0.9%	1.0%
2nd metabolism key enzymes	14	3	0.2%	<b>1.0%</b>
2nd metabolism related	99	5	1.3%	1.6%
Signaling	433	10	5.5%	<b>3.3%</b>
Transcription factors	313	7	4.0%	<b>2.3%</b>
Methyltransferases	97	2	1.2%	<b>0.7%</b>
Not classified	4390	107	54.0%	<b>36.2%</b>
<b>Total</b>	<b>7738</b>	<b>304</b>		

## 8.3 Zusätzliche digitale Tabellen

Verschiedene Excel-Dateien, die zur Auswertung komplexer Datensätze erstellt/ verwendet wurden, sind auf CD digital angehängt und in meiner Dropbox verfügbar:

<https://www.dropbox.com/sh/81fsbjoharvg2ys/AABYL40XtlvdKcM10v42O-Rna?dl=0>

### 8.3.1 RNAseq-Tabelle\_final\_NM\_Dissertation

Mithilfe von CLC Genomics workbench ausgewertete RNAseq-Daten (*B. cinerea* Genomversion V5 (11990 Gene inklusive Splicingvarianten))

#### RNAseq Fold changes und RPKM-Werte

- Differenziellen Genexpression der drei VELVET Mutanten *vel1\**, *lae1* und *vel1*
- Differenzielle Genexpression *B. cinerea* vs. *B. fabae* Projekts (ausschließlich mapping auf *B. cinerea*-Sequenzen!)

#### Zusatzinformationen in der Tabelle

- auf BLAST basierten Konvertierungslisten in andere Genomsequenzannotationen (BofuT4; BcT4; V1 (BC1G\_XXXX); V3 (B0510\_XXXX); Ensemble 08/15 (BcinXXgXXXX.1))
- Informationen über die *in silico* Sekretionsvorhersage, Name und Referenz zu bereits bekannten Genen, Informationen über putative Funktion z.B. PFAM-Domänen (Finn *et al.*, 2016)
- Funktionelle Klassifizierung

### 8.3.2 Sekretomtabelle\_final\_NM\_Dissertation

Grundlage *B. cinerea* ensemble.org Sequenzen (08/15; 12104 Proteine inklusive Splicingvarianten)

#### Tabellenblatt A: Gesamtliste 203 sekretierte *B. cinerea* Proteine

Auflistung aller während der Infektion von Tomatenblättern durch *B. cinerea* sekretierten Proteine aus der qualitativen MS/MS-Analyse (Fabae-Projekt) und der <sup>15</sup>N-Quantifizierung (VELVET Projekt), die in mindestens einem der Versuche in mindestens 2 von 3 Replikaten vertreten waren und zusätzlich *in silico* sekretiert sind.

- Je 1 Spalte „MS-peptide ion intensities“ der beiden Analysen
- Putative Funktion der Proteine, Funktionelle Klassifizierung der Proteine
- Vorkommen der Proteine in verschiedenen vorher durchgeführten Sekretom-Analysen
- RNAseq *in planta* Induktion (WT *in vitro* vs. 24 h Tomateninfektion)

#### Tabellenblatt B: <sup>15</sup>N-Quantifizierung von 160 *B. cinerea* Proteinen im VELVET-Projekt

Auflistung aller *in silico* sekretierten *B. cinerea* Proteine, die während der Infektion von Tomatenblättern durch *B. cinerea* Wildtyp im Vergleich mit *lae1* bzw. *vel1\** quantifizierbar waren.

- Fold changes *vel1\** bzw. *lae1* vs. Wildtyp (<sup>15</sup>N-quantification)
- Spalte „MS-peptide ion intensities“ (<sup>14</sup>N median quantification des Wildtyps)
- Putative Funktion der Proteine, Funktionelle Klassifizierung der Proteine
- RNAseq *in planta* Induktion (WT *in vitro* vs. 24 h Tomateninfektion)
- RNAseq differenzielle Expression *vel1\**, *lae1*, *vel1*

#### Tabellenblatt C: *B. cinerea* vs. *B. fabae* Sekretom

Liste aller *in silico* sekretierten *B. cinerea* und *B. fabae* Proteine (MS qualitative Auswertung)

- MS-peptide ion intensity: B05.10 bzw. 11002 auf Tomate/Bohne
- Putative Funktion der Proteine, Funktionelle Klassifizierung der Proteine

## Tabellenblatt D: Alle Daten

Vollständige Liste aller *B. cinerea* (12104) und *B. fabae* Proteine (12191)

→ Gesamttabelle aller Daten aus Tabellenblättern A-C

- Proteinsequenzen, Sequenz-IDs: *B. cinerea* & *B. fabae* (11002 Velvet-assembly)
- Putative Funktion, Funktionelle Klassifizierung der Proteine
- PFAM output, BlastP Treffer (aus RNAseq Tabelle übertragen! Basierend auf V5-Version)
- *In silico* Vorhersage ob das Protein sekretiert wird
- Vorkommen der Proteine in verschiedenen vorher durchgeführten Sekretom-Analysen
- RNAseq *in planta* induction (WT *in vitro* vs. 24 h Tomateninfektion)
- RNAseq differenzielle Expression *vel1\**, *lae1*, *vel1*
- Fold changes *vel1\** bzw. *lae1* vs. Wildtyp (<sup>15</sup>N-quantification)
- Spalte „MS-peptide ion intensities“ (<sup>14</sup>N median Quantifizierung des Wildtyps)
- Einzelwerte aus MS/MS-Analyse Fabae-Projekt

## 8.4 Methoden

### 8.4.1 Quantitative proteome analysis by <sup>15</sup>N metabolic labeling

After tryptic in-gel digestion (Veyel *et al.*, 2014), MS analysis was performed on a high resolution LC-MS system (Eksigent nanoLC425 coupled to a Triple-TOF 6600+, Sciex, Concord, Canada) in information dependent acquisition (IDA) mode. HPLC separation was performed in trap-elution mode using TriartC18 columns (5 µm particle, 0.5 × 5 mm for trapping and 3 µm particle, 300 µm × 150 mm for separation, YMC). A constant flow of 4 µl min<sup>-1</sup> was employed and the gradient ramped within 40 min from 2 to 35% of HPLC buffer B (buffer A: 2% acetonitrile, 0.1% formic acid; buffer B: 90% acetonitrile, 0.1% formic acid), then within 7 min to 50% HPLC buffer B, followed by washing and equilibration steps. The mass spectrometer was run in IDA mode recording one survey scan (250 ms, 350–1250 m/z) and fragment spectra (100–1500 m/z) of the 20 most intense parent ions (70ms, charge state >2, intensity >400 cps). MS data analysis was carried out using BioFSharp.MZ (<https://github.com/CSBiology/BioFSharp.Mz>). Peptide identification was based on the computed cross correlation between theoretical and measured spectra with mass tolerance of 15 ppm and up to three considered miss cleavages. The peptide sequences were generated from peptide models of *B. cinerea* B05.10 ([http://fungi.ensembl.org/Botrytis\\_cinerea/Info/Index](http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/Info/Index)) combined with tomato ([https://solgenomics.net/organism/Solanum\\_lycopersicum/genome](https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome)) considering <sup>14</sup>N light and <sup>15</sup>N heavy stable modification. Peptide quantification was based on <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N pairwise peak integration and subsequent calculation of the area ratios normalized to total sum per sample. Protein identification and inference was performed using percolator v3.1.2 (<https://github.com/percolator/percolator>) with FDR threshold ≤1%.

### 8.4.2 Analysis of transcriptome and proteome data correlation

All samples were normalized method-specific to minimize technical influences. Statistical significance of differentially expressed genes was assessed using a Wald test with Benjamini-Hochberg adjustment (adj. p-value ≤0.05). For assessing significant altered protein abundances, a one-way ANOVA followed by post hoc test according to Hays method was run with significance threshold (p-value ≤0.05). Heat map representation was sorted according to common behaviors in the data sets by hierarchical clustering. Analysis of overrepresentation of certain functional categories was done using hypergeometric formulation of the null hypothesis to test that the change in protein abundance and its belonging to an annotation category are statistically independent (Rivals *et al.*, 2007). Analyses and calculations were performed using Microsoft F# functional programming language with the bioinformatics library BioFSharp (available on GitHub: <https://github.com/CSBiology/BioFSharp>) and the graphical library FSharp.Plotly (available on GitHub: <https://github.com/muehlhaus/FSharp.Plotly>).

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Infektionszyklus von <i>Botrytis cinerea</i> (Agrios, 2005).	6
Abb. 2: Pathogene Pilze modulieren den externen pH zur Aktivierung von Virulenzfaktoren.	8
Abb. 3: Schematische Darstellung der Pflanzen-Pilz-Interaktion mittels sekretierter Proteine.	10
Abb. 4: Schematische Zusammenfassung der Signaltransduktionskaskaden, welche die Differenzierung und Virulenz in <i>B. cinerea</i> regulieren.	11
Abb. 5: Schematisches Modell der Kontrolle des Sekundärmetabolismus und der Entwicklung durch VELVET-Proteine und Methyltransferasen in <i>A. nidulans</i> .	15
Abb. 6: Die VELVET-Familien Proteine in <i>B. cinerea</i> .	16
Abb. 7: Lokalisierung der VELVET-Komplex-Proteine in <i>B. cinerea</i> .	17
Abb. 8: Phänotypische Merkmale von <i>Botrytis fabae</i> .	18
Abb. 9: Differenzierung von <i>B. cinerea</i> Wildtyp und Mutanten auf verschiedenen Oberflächen.	21
Abb. 10: Vegetativer Wachstumstest/Stresstest im Vergleich zwischen <i>B. cinerea</i> Wildtyp und Mutanten.	22
Abb. 11: Infektion von Tomatenblättern durch <i>B. cinerea</i> Wildtyp und Mutanten.	23
Abb. 12: BMP1-Phosphorylierungsstudie in <i>B. cinerea</i> Wildtyp und Mutanten.	24
Abb. 13: Yeast two-hybrid Protein-Interaktionen des <i>B. cinerea</i> Sensorproteins Msb2.	25
Abb. 14: Hyphenbildung und Differenzierung im Vergleich zwischen <i>B. cinerea</i> Wildtyp (WT) und der <i>arp1</i> Mutante (T13).	29
Abb. 15: Infektionsphänotyp der <i>B. cinerea arp1</i> Mutante.	30
Abb. 16: Komplementation der <i>vel1*</i> Mutante mit verschiedenen <i>vel1</i> -Konstrukten, sowie künstliche Erzeugung des <i>vel1*</i> -KO-Phänotyps durch Integration von VEL1*-GFP.	32
Abb. 17: Lokalisierung von VELVET-Komplex Proteinen in Wildtyp, <i>vel1</i> oder <i>vel2</i> Mutante.	34
Abb. 18: Vegetatives Myzelwachstum und lichtabhängige Differenzierung des <i>B. cinerea</i> Wildtyps (WT) und verschiedener VELVET-Mutanten auf Agarplatten.	35
Abb. 19: Infektionsphänotyp der VELVET-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT).	36
Abb. 20: Modifikation des externen pH-Werts durch <i>B. cinerea</i> Wildtyp und VELVET-Mutanten.	37
Abb. 21: Sekretion organischer Säuren durch <i>B. cinerea</i> Wildtyp und VELVET-Mutanten.	38
Abb. 22: Phänotypische Charakterisierung der <i>oahA</i> Mutante.	40
Abb. 23: Effekte der pH-Manipulation auf die Läsionsausbreitung in Tomatenblättern (48 h).	41
Abb. 24: Einfluss von Vollmedium auf Infektion und Ansäuerung bei <i>B. cinerea</i> Wildtyp (WT) und Mutanten.	42
Abb. 25: RNAseq basierte differenzielle Expression in <i>B. cinerea</i> VELVET-Mutanten.	44
Abb. 26: Funktionelle Klassifizierung der 304 in VELVET-Mutanten koregulierten Gene.	45
Abb. 27: Differenzielle Expression von Sekundärmetabolismus-Genclustern in <i>B. cinerea in planta</i> und in VELVET-Mutanten.	46
Abb. 28: Das <i>B. cinerea on planta</i> Sekretom.	48
Abb. 29: In VELVET-Mutanten koregulierte sekretierte Proteasen.	50
Abb. 30: Radiale Läsionsausbreitung von <i>B. cinerea</i> und <i>B. fabae</i> nach 72 h unter unterschiedlichen Nährstoffbedingungen.	51
Abb. 31: pH-Verlauf während der Infektion von Tomatenblättern bzw. Ackerbohnenblättern im	52
Abb. 32: Infektionsdefekt der VELVET-Mutanten auf Ackerbohnenblättern.	53
Abb. 33: Funktionelle Klassifizierung der 529 zwischen <i>B. fabae</i> und <i>B. cinerea</i> auf Ackerbohne (48 h) differenziell exprimierten Gene.	54
Abb. 34: Funktionelle Klassifizierung sekretierter <i>B. cinerea</i> - und <i>B. fabae</i> -Proteine auf verschiedenen Wirtspflanzen.	56
Abb. 35: Proteaseaktivität in <i>B. cinerea</i> und <i>B. fabae on planta</i> Exudaten.	57
Abb. 36: Interaktionsmodell der BMP1-MAPK-Kaskade und assoziierter Proteine in <i>B. cinerea</i> .	62
Abb. 37: Interaktionen und Lokalisierungen der VEL1 Proteinvarianten <i>B. cinerea</i> .	63
Abb. 38: Proteine des VELVET-Komplex in <i>B. cinerea</i> steuern unterschiedliche Zellantworten.	68
Abb. Anhang 1: Differenzierung von Keimschläuchen im Vergleich zwischen Wildtyp und <i>sho1</i> Mutante, sowie der <i>sho1</i> Komplementante.	110



## Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse

Abb. Anhang 2: Verifizierung zweier mit Msb2 interagierender Proteine mittels Yeast two-hybrid Analyse.....	110
Abb. Anhang 3: Konstruktion verschiedener <i>vel1*</i> Mutanten und Komplementationsstämme.....	111
Abb. Anhang 4: Die <i>sho1</i> Komplementation in der <i>vel1*</i> Mutante.....	112
Abb. Anhang 5: Komplementation des <i>vel2</i> Deletionsphänotyps mittels Integration von VEL2-GFP.....	112
Abb. Anhang 6: Sekretion organischer Säuren <i>in vitro</i> durch <i>B. cinerea</i> Wildtyp (WT) und Mutanten, und <i>oahA</i> Phänotyp im späten Infektionsstadium.....	113
Abb. Anhang 7: Einfluss von Vollmedium auf die Expression Virulenz-assoziiierter Gene und Proteaseaktivität während der Infektion durch <i>B. cinerea</i> Wildtyp (WT) und Mutanten.....	114
Abb. Anhang 8: Vergleich des Einflusses verschiedener Hexosen auf Azidifizierung und Infektion.....	115
Abb. Anhang 9: Koregulation der in VELVET-Mutanten differenziell exprimierten Gene.....	116
Abb. Anhang 10: Klassifizierung der in VELVET-Mutanten differentiell sekretierten Proteine.....	116
Abb. Anhang 11: Korrelation von mRNA- und Protein-Level der Expressionsunterschiede sekretierter Proteine im Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und VELVET-Mutanten.....	117
Abb. Anhang 12: Inhibierung der Proteaseaktivität des <i>B. cinerea on planta</i> Exudats von Tomate...	117
Abb. Anhang 13: In VELVET-Mutanten koreguliert sekretierte CAZymes.....	118

## 10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Virulenz assoziierte Proteine und deren Relevanz für die Pathogenese von <i>B. cinerea</i> .....	7
Tab. 2: Übersicht der zur Analyse der BMP1-MAPK-Kaskade in <i>B. cinerea</i> deletierten keimungsregulierten Gene.....	27
Tab. 3: Phänotypische Charakterisierung der KO-Mutanten keimungsregulierter Gene.....	28
Tab. 4: Verteilung pilzlicher und pflanzlicher Proteine während der Infektion mit <i>B. cinerea</i> Wildtyp und Mutanten <i>on planta</i> (48 h).....	49
Tab. 5: Nachweis von <i>Botrytis</i> -Proteinen in den Sekretomen von <i>B. cinerea</i> und <i>B. fabae</i> .....	55
Tab. 6: Verwendete Medien und Lösungen.....	72
Tab. 7: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	77
Tab. 8: Verwendete Hefestämme.....	78
Tab. 9: Verwendete <i>Botrytis</i> Stämme.....	79
Tab. 10: Name, Sequenz und Verwendungszweck der eingesetzten Primer.....	81
Tab. 11: Verwendete Plasmide.....	85
Tab. Anhang 1: Keimungsregulierung und <i>in planta</i> Expression der zur Analyse der BMP1-MAPK-Kaskade deletierten Gene.....	119
Tab. Anhang 2: Enrichment-Analyse funktioneller Klassen der differenziell in den VELVET-Mutanten <i>lae1</i> , <i>vel1*</i> und <i>vel1</i> koregulierten Gene.....	119

# Lebenslauf Nathalie Müller

## Ausbildung & Akademischer Werdegang

---

Januar 2013 - März 2017	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Kaiserslautern in der AG Phytopathologie (Prof. Dr. Matthias Hahn) Abschluss der <b>Dissertation</b> Dezember 2017
April 2011 - Dezember 2012	Studium an der TU Kaiserslautern <b>Master of Science</b> (BioSciences/Biowissenschaften) Vertiefungsrichtung Mikrobiologie/Biotechnologie Note <b>1,2</b>
April 2008 - März 2011	Studium an der TU Kaiserslautern <b>Bachelor of Science</b> (Biowissenschaften) Note <b>2,0</b>
August 1999 - März 2008	Paul-Schneider-Gymnasium Meisenheim <b>Allgemeine Fachhochschulreife</b> Note <b>1,3</b>

## Titel der Dissertation

---

Pathogene Differenzierung von *Botrytis cinerea* - Molekulare Grundlagen und Rolle des VELVET-Komplexes

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

---

Leroch M., **Mueller N.**, Hinsenkamp I. und Hahn M. (2015). The signalling mucin Msb2 regulates surface sensing and host penetration via BMP1 MAP kinase signalling in *Botrytis cinerea*. Molecular Plant Pathology 16:787-798.

Daumann M., Golfier P., **Knüppel N.**, Hahn M., Möhlmann T. (2016). *Botrytis cinerea* can import and utilize nucleosides in salvage and catabolism and BcENT functions as high affinity nucleoside transporter. Fungal Biology 8:904-916.

# Danksagung

Als erstes möchte ich Matthias Hahn ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken, in der ich gerne gearbeitet und sehr viel gelernt habe. Danke für die Möglichkeit zur Mitarbeit an interessanten und komplexen Projekten und zahlreiche konstruktive und spannende Diskussionen während meiner Doktorarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Ekkehard Neuhaus für die Begutachtung meiner Dissertation, und seiner Arbeitsgruppe, vor allem Wolfgang Jeblick, für die Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe.

Sandro Keller möchte ich vielmals für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Während meiner Zeit als Doktorandin habe ich die Bachelorarbeiten von Julia Schwing, Frederic Gläs, Thomas Leisen, Sophia Grüner, Anne Könnel und Janina Werner, sowie die Masterarbeiten von Katharina Stephenson, Maya Giridhar, Sylvia Thoms & Juliane Schurig und Anne Könnel betreut, denen ich an dieser Stelle ganz besonders für ihr Engagement danken will. Nur dank euren fleißigen Händen war es mir möglich so viele verschiedene Projekte und Experimente anzugehen!

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Phytopathologie möchte ich für die wahnsinnig tolle Arbeitsatmosphäre danken. Ohne die gegenseitige Unterstützung, die kleinen und großen netten Gesten und die Schokoladenpausen, in denen ich meinem Redebedarf freien Lauf lassen durfte, hätte mir die Arbeit niemals so viel Spaß gemacht! Ein großes Dankeschön geht an Cecilia Plesken und besonders Sabrina Rupp, die mich während unserer gemeinsamen Zeit als Doktorandinnen nicht nur im Labor gestützt haben. David Scheuring und Fabian Bietz danke ich für den frischen Wind in der Arbeitsgruppe und die gegenseitige Hilfe gerade in der Endphase.

Michael Schroda, Frederik Sommer, Timo Mühlhaus und besonders David Zimmer möchte ich ganz herzlich für die MS-Analysen, die erfolgreiche Zusammenarbeit und die großzügigen Hilfestellungen danken.

Ein fettes Dankeschön möchte ich Klaus Klug für allen Beistand bei technischen und bioinformatischen Fragestellungen aussprechen, aber auch für die kritische Hinterfragung jeglicher Versuchsansätze und die immer gut gemeinten persönlichen Ratschläge. Danke an Patrick Pattar für die phänomenale Abarbeitung noch so komplexer Arbeitspläne, nichts war dir zu viel! Auch bei Annette Fuchs möchte ich mich für die Hilfe bei der täglichen Laborarbeit bedanken und ich wünsche ihr vor allem gesundheitlich von Herzen alles Gute. Christa Jung möchte ich dafür danken, dass sie mir nicht nur bei Papierkrieg zur Seite stand, sondern auch immer wieder ein Anker war. Liebe Christa, deine Komplimente sind so aufbauend, wie könnte man da jemals frustriert sein?

Ganz besonders möchte ich Michaela Leroch danken, die mich trotz Babyboom mit immer guter Laune und viel Geduld begleitet hat, stets ein offenes Ohr, Lösungsansätze und neue Ideen parat hatte, und durch ihre Kompetenz entscheidend zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen hat. Micha, ich habe so unglaublich viel von dir gelernt, obwohl du immer viel mehr meine Freundin als eine Chefin warst. Danke für Alles!

Meine ehemaligen „Laborküken“ Janina und besonders Anne möchte ich hier noch einmal hervorheben und Danke sagen. Wir waren nicht nur im Labor ein super Team, sondern ihr streut mir immer noch täglich Konfetti in mein Leben. Ihr seid einfach toll.

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Besten, die mit mir durch dick und dünn gehen, und immer wieder durch gemeinsame Zeit meine Energietanks mit Sonnenschein füllen. Was gibt es Wichtigeres als Freundschaften, die die guten Zeiten besser machen und uns die schlechten vergessen lassen!

Von Herzen danken möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern und meinem Bruder. Danke für die großartige Unterstützung nicht nur während meines Studiums und der Doktorarbeit, sondern weit darüber hinaus.

DANKE ♥

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation am Fachbereich Biologie der TU Kaiserslautern selbstständig verfasst habe und nur die im Text angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Die Extraktion von Proteinen aus *Botrytis*-Exudaten, sowie die Messung der Proteaseaktivitäten wurden hauptsächlich von Anne Könnel, die BMP1-Phosphorylierungsstudie von Janina Werner durchgeführt. Die Konzentrationen organischer Säuren wurden von Wolfgang Jeblick (AG Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern) bestimmt. Weitere Ergebnisse, die in Zusammenarbeit mit anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe oder in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen entstanden sind, sind entsprechend gekennzeichnet. Aus den Abschlussarbeiten folgender von mir betreuter Personen werden Ergebnisse präsentiert:

## Bachelorarbeiten

Frederic Victor Gläs (2014) „Erstellen von Knockout-Konstrukten und Analyse von KO Mutanten in *Botrytis cinerea*“.

Julia Christine Schwing (2014) „Analyse der Signalwege die durch das Sensorprotein Sho1 während der Infektion von *Botrytis cinerea* reguliert werden“.

Thomas Leisen (2015) „Ausscheidung organischer Säuren und Azidifizierung des Mediums durch *B. cinerea* Wildtyp und *sho1*-KO Mutante“.

Sophia Grüner (2015) „Analyse der Rolle von Ctf1 $\beta$  in *Botrytis cinerea* und phänotypische Charakterisierung eines Ankyrin repeat Protein Knockouts“.

Anne Könnel (2015) „Die Rolle der Toxinbiosynthese von Botrydial und Botcinin bei der Infektion von *Botrytis* spp.“.

Janina Werner (2017) „Untersuchungen zur Funktion und Lokalisierung von VELVET Proteinen in *Botrytis cinerea*“.

## Masterarbeiten

Katharina Stephenson (2015) „Analyse art- und stammspezifischer Gene sowie putativer Virulenzfaktoren bei *Botrytis*“.

Maya Giridhar (2016) „Establishing PCR conditions for single and multiplex amplification of *Botrytis* genes for Next Generation Sequencing based Multi Locus Sequence Typing and Mutagenesis of genes related to the Velvet complex in *Botrytis cinerea*“.

Sylvia Thoms und Juliane Schurig (2016) „The secretome of *Botrytis cinerea* wild-type and mutant strains *in vitro* and *on planta*“.

Anne Könnel (2017) „Vergleichende phänotypische, Transkriptom- und Sekretom-Analysen von *Botrytis cinerea* und *Botrytis fabae*“.



Kaiserslautern, Dezember 2017