

Untersuchungen zur frühen Infektion der Weizenblüte durch *Fusarium graminearum*

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Anika Glasenapp

Hamburg, Oktober 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hoth

Datum der Disputation: 01. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII

1. Einleitung	01
1.1 Der phytopathogene Pilz <i>Fusarium graminearum</i>	01
1.2 Sekundärmetabolite von <i>F. graminearum</i>	03
1.2.1 Deoxynivalenol (DON)	03
1.2.2 Aurofusarin	04
1.2.3 Butenolid	05
1.3 Mitochondriale Energieerzeugung in Pflanzen	05
1.4 Cerato-platanine	06
1.5 Zielsetzung der Arbeit	08
2. Material und Methoden	09
2.1 Material	09
2.1.1 Chemikalien	09
2.1.2 Enzyme	09
2.1.3 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)	09
2.1.4 Molekulargewichtsstandards	12
2.1.5 Vektoren	12
2.1.6 Verwendete Kits	13
2.1.7 Verwendete Organismen	13
2.2 Methoden	14
2.2.1 <i>in situ</i> Analysen	14
2.2.2 Kultivierungsbedingungen	15
2.2.3 Isolierung von genomischer DNA mit CTAB	17
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Nukleinsäure-Gelelektrophorese	18
2.2.5 Klonierungsstrategien zur Erstellung von Plasmiden	19
2.2.5.1 Hefe-Rekombinationsklonierung	19
2.2.5.2 Klassische Klonierung	22
2.2.5.3 Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	23
2.2.6 Protoplasten-Transformation von <i>F. graminearum</i>	23
2.2.7 Vereinzelung von Konidien	25
2.2.8 Methoden zum Nachweis einer Gendeletion und -überexpressionen	25
2.2.8.1 Phenol-Chloroform Extraktion von gesamt-RNA	25
2.2.8.2 cDNA Synthese und Überprüfung via PCR	26
2.2.8.3 Quantitative RealTime PCR (qRT-PCR)	26
2.2.8.4 Southern Blot	28
2.2.9 Charakterisierung von Deletions- und Überexpressionsmutanten	29
2.2.9.1 Quantifizierung von pilzlicher DNA in infiziertem Pflanzenmaterial	29
2.2.9.2 Pathogenitätstests auf Weizen mit <i>F. graminearum</i>	30
2.2.9.3 Histologische Untersuchung von infizierten Weizenähren	31

2.2.9.4 Chemische Komplementation und Vorbehandlung von Weizenähren mit synthetischem Butenolid	31
2.2.9.5 Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Weizenvorspelzen nach Vorbehandlung mit synthetischem Butenolid bzw. nach der Infektion mit <i>F. graminearum</i>	32
2.2.9.6 Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	34
2.2.9.7 Untersuchungen zur Wirkung von Butenolid auf das Wachstum von Pilzen und Bakterien.....	34
2.2.9.8 Untersuchung zur Wirkung von Butenolid auf die Regeneration von Protoplasten von <i>F. graminearum</i>	35
2.2.9.9 Extraktion des Polyketids Aurofusarin (AUR) aus dem <i>F. graminearum</i> Wildtypstamm 8/1 und einer AUR-defizienten Mutante	36
2.2.9.10 Untersuchungen zur Wirkung von Aurofusarin auf das Wachstum von gram-negativen Bakterien.....	36
2.2.9.11 LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Deoxynivalenol und Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial und Kulturüberständen.....	36
2.2.9.12 Untersuchung des <i>in vitro</i> Wachstums unter oxidativen und osmotischen Stressbedingungen	38
2.2.9.13 Epifluoreszenzmikroskopie	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Validierung eines differentiellen Transkriptoms mittels qRT-PCR.....	40
3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Weizenblüteninfektion.....	43
3.2.1 Die DON-Synthese ist entscheidend für die frühe Phase der Infektion von Weizen.....	43
3.2.2 <i>In silico</i> Analyse der Butenolid-Clustergene.....	46
3.2.3 Bestimmung des Butenolids im Zeitverlauf der frühen Infektion von <i>F. graminearum</i> auf Weizen.....	47
3.2.4 Erstellung und Nachweis von Deletions- und Komplementationsmutanten des Gens FGSG_08079.....	51
3.2.5 Die Komplementation von FGSG_08079 führt zu einer veränderten Expression der Butenolid-Clustergene während der Weizeninfektion	56
3.2.6 Das Fehlen von Butenolid führt zu einer erhöhten Virulenz von <i>F. graminearum</i> während der frühen Infektionsphase auf Weizen	58
3.2.7 Das Fehlen von Butenolid hat keinen Einfluss auf die Synthese des Mykotoxins Deoxynivalenol.....	63
3.2.8 Die DON-Synthese unter DON-induzierenden <i>in vitro</i> Bedingungen ist in den Deletionsmutanten erhöht.....	64
3.2.9 Die nachträgliche Behandlung inokulierter Weizenblüten mit Butenolid führt zur chemischen Komplementation einer Δ But Mutante.....	68
3.2.10 Erstellung und Nachweis von Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_08079	70

3.2.11 Die Überexpression von FGSG_08079 führt zu einer veränderten Expression der Butenolid-Clustergene während der Weizeninfektion	72
3.2.12 Die erhöhte Expression von FGSG_08079 führt zu einer verringerten Butenolid-Synthese während der Weizeninfektion	74
3.2.13 Die Überexpression von FGSG_08079 führt zu einer Verringerung der Virulenz während der frühen Phase der Weizeninfektion.....	75
3.2.14 Die verringerte <i>in planta</i> Butenolid-Synthese der Überexpressionsmutanten hat keinen Einfluss auf die Synthese des Mykotoxins Deoxynivalenol.....	78
3.2.15 Unter DON-induzierenden Bedingungen <i>in vitro</i> weisen OE_08079 Mutanten eine verringerte DON-Synthese auf	79
3.2.16 Das Sekundärmetabolit Butenolid führt zum Einbruch der ATP-gekoppelten Respiration in Weizenvorspelzen	82
3.2.17 Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) -Färbung Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen.....	90
3.2.18 Die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid führt in der frühen Infektionsphase zu einer Verringerung der Virulenz von <i>F. graminearum</i>	91
3.2.19 Das Sekundärmetabolit Butenolid von <i>F. graminearum</i> beeinflusst das Wachstum von Bakterien, Hefen und filamentösen Pilzen <i>in vitro</i>	92
3.2.20 Die Regeneration von Protoplasten des 8/1_DsRed Stammes ist unter Einfluss von Butenolid verändert	96
3.2.21 Das Polyketid Aurofusarin hat keinen Einfluss auf das Wachstum gram-negativer Bakterien	97
3.2.22 Fazit: Sekundärmetabolite sind ein entscheidender Faktor während der Infektion von Weizen durch <i>F. graminearum</i>	98
3.3 Analysen zur Bedeutung der Cerato-platanin Proteine FgCPP1 und FgCPP2 für die Infektion von Weizen durch <i>F. graminearum</i>	99
3.3.1 <i>In silico</i> Analyse und Vergleich von Cerato-platanin Proteinen diverser Pilze	99
3.3.2 Generierung von Einzel- und Doppel-Deletionsmutanten für FgCPP1 (FGSG_10212) und FgCPP _{1,2} (FGSG_10212, FGSG_11205)	102
3.3.3 ΔFgCPP Mutanten bilden Wildtyp-ähnliche Infektionsstrukturen während der Infektion auf Weizenvorspelzen aus.....	105
3.3.4 Die Deletion zweier Cerato-platanin Gene hat keinen Einfluss auf die Virulenz von <i>F. graminearum</i>	106
3.3.5 Die Deletion von FgCPP1 und FgCPP2 führt nicht zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem oder osmotischem Stress.....	107
3.3.6 Fazit: Die Cerato-platanin Proteine FgCPP1 und FgCPP2 haben keinen Einfluss auf die Weizenblüteninfektion von <i>F. graminearum</i>	108
4. Diskussion.....	109
4.1 Expressionsprofile differentieller Transkriptome können mittels qRT-PCR validiert werden	109
4.2 Das Mykotoxin DON ist ein wichtiger Virulenzfaktor für die initiale Infektionsphase von Weizen.....	110
4.3 Das Sekundärmetabolit Butenolid wird in der frühen Phase der Infektion von Weizen gebildet	113

4.4 Butenolid defiziente Mutanten weisen in der frühen Infektionsphase von Weizen eine erhöhte Virulenz auf	115
4.5 Die konstitutive Expression von FGSG_08079 führt sowohl zu einer verringerten Butenolid-Synthese als auch zu einer verringerten Virulenz in der frühen Phase der Weizeninfektion.....	120
4.6 Die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid führt zu einer Reduktion der Virulenz von <i>F. graminearum</i> auf Weizen.....	122
4.7 Die Produktion von DON und Butenolid unter Kulturbedingungen unterscheidet sich von der Produktion während der Weizeninfektion.....	123
4.8 Butenolid beeinflusst die nicht-mitochondriale Atmung in Weizenvorspelzen.....	125
4.9 Butenolid beeinflusst sowohl das Wachstum von Bakterien und filamentösen Pilzen <i>in vitro</i> als auch die Regeneration von <i>F. graminearum</i> Protoplasten	130
4.10 Gram-negative Bakterien werden nicht durch die Präsenz des Polyketids Aurofusarin im Wachstum beeinträchtigt.....	132
4.11 Die Cerato-platanine FgCPP1 und FgCPP2 sind nicht an der Infektion von Weizen beteiligt	133
5. Zusammenfassung	136
6. Abstract	138
7. Literaturverzeichnis	140
8. Anhang.....	XII
Danksagung.....	XXI
Eidesstattliche Erklärung	XXII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
A-DON	Acetyldeoxynivalenol
AF	Aflatoxin
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
AG	Arbeitsgruppe
AI	Autoinducer
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
Amp	Ampicillin
AOX	Alternative Oxidase
AS	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
AUR	Aurofusarin
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>B. distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
bp	Basenpaare
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BUT	Butenolid
<i>C. carbonum</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
<i>C. heterostrophus</i>	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>
CM	Komplettmedium (engl. complete media)
<i>C. nicotianae</i>	<i>Cercospora nicotianae</i>
CP(P)	Cerato-platanin Protein
<i>C. platani</i>	<i>Ceratocystis platani</i>
Ct	engl. Cycle threshold
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
<i>C. victoriae</i>	<i>Cochliobolus victoriae</i>
DAB	Diamonibenzidin
dd	Doppelt destilliert
dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Desoxynivalenol
dpi	Tage nach der Inokulation (engl. days post inoculation)
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Deoxyuridin-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Effektor
ETC	Elektronentransportkette (engl. electron transport chain)
EW	Einzelwert

FCCP	Cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
<i>F. graminearum</i> (FG)	<i>Fusarium graminearum</i>
FgL1	<i>F.graminearum</i> Lipase 1
FHB	Fusarium Head Blight
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>
FPKM	Fragmente pro Exon-Kilobase pro Millionen annotierter Fragmente (engl. Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped)
FS	Fußstrukturen
fw	forward
GA (engl. LA)	gelappte Appressorien (engl. lobate appressoria)
GABA	4-Aminobuttersäure
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierende Protein
gpd	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase
gta	GABA-Transaminase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)
HR	Hypersensitive Reaktion
HygB	Hygromycin B
IK (engl. IC)	Infektionskissen (engl. infection cushions)
IMM	Innere Mitochondrienmembran
KDO	Keto-desoxy-octonat
Komp	Komplementation
LB	engl. lysogeny broth
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie- Massenspektometrie/Massenspektometrie
LF (engl. RH)	Laufhyphen (engl. runner hyphae)
LF	Linke Flanke
LPS	Lipopolysaccharid
<i>M. aureus</i>	<i>Micrococcus aureus</i>
MFS	engl. major facilitator superfamily
<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
MM	Minimalmedium
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
<i>M. pilosus</i>	<i>Monascus pilosus</i>
MR	Mitochondriale Atmung
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
MY	Myzel; axenische Kultur
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NAT	Nourseothricin
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

<i>N. haematococca</i>	<i>Nectria haematococca</i>
N-HSL	N-Acylhomoserin-Lactone
NMR	Nicht-mitochondriale Atmung
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate)
OD	Optische Dichte
OE	Überexpression (engl. over expression)
ORF	Offener Leserahmen (engl. open reading frame)
PEG	Polyethylenglykol
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PKS	Polyketidsynthase
ppm	Parts per million
qRT-PCR	Quantitative RealTime Polymerase-Kettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
REST	Relative Expression Software Tool
RF	Rechte Flanke
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
rv (rev)	reverse
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNA	engl. synthetic nutrient poor agar
<i>S. nodorum</i>	<i>Stagonospora nodorum</i>
SNP	Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism)
ST	Sterigamtocystin
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TCA	Tricarbonsäure
TE	Tris-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tub	Tubulin
URA3	Gen zur Uracil Synthese
UTR	Untranslatierte Region
ü.N.	über Nacht
YPD	Yeast Pepton Dextrose (Vollmedium)

Abbildungen

Abb. 1: Schadbilder von FHB auf Weizen (links) und der Kolbenfäule auf Mais (rechts) im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen (H ₂ O)	01
Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Infektionsstrukturen von <i>F. graminearum</i> auf Weizenhüllspelzen	02
Abb. 3: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette in Pflanzen.....	06
Abb. 4: Schematische Darstellung der Hefe-Rekombinationsklonierung.....	19
Abb. 5: Aufbau einer Weizenblüte	30
Abb. 6: Schematische Darstellung des Messprinzips an einem „XF24 extracellular flux analyzer“ (Seahorse Bioscience, North Billerica, Vereinigte Staaten von Amerika) mit dem XF Cell Mito Stress-Kit	33
Abb. 7: qRT-PCR differentiell exprimierter Gene zur Validierung von Transkriptomdaten.....	42
Abb. 8: Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B) von einer Δ Tri5_GFP Mutante und dem 8/1_GFP Stamm	44
Abb. 9: Überprüfung des <i>in vitro</i> Wachstums auf CM-Agar	45
Abb. 10: Schematische Darstellung der genomischen Anordnung der Butenolid-Clustergene	46
Abb. 11: PCR für den Transkriptnachweis der Butenolid Clustergene im Zeitverlauf der frühen Infektion von <i>F. graminearum</i> auf Weizen	49
Abb. 12: Graphische Darstellung der Bandenintensitäten der Butenolid-Clustergene im Vergleich zu β -Tubulin im Zeitverlauf.....	50
Abb. 13: Generierung von Deletionsmutanten des Gens FGSG_08079 mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen Deletion	53
Abb. 14: Generierung von Komplementationsmutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Integrationsnachweis	54
Abb. 15: Expressionsanalyse der Gene des Butenolid-Clusters während der Weizeninfektion von Δ But- Mutanten und des 8/1_DsRed Stammes (5 dpi) ...	57
Abb. 16: Überprüfung der Pathogenität generierter Δ But- und Δ But- Mutanten auf Weizen des Kultivars „Nandu“	59
Abb. 17: Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B) von Deletions- und Komplementationsmutanten.....	61
Abb. 18: Überprüfung des <i>in vitro</i> Wachstums auf CM-Agar	62
Abb. 19: Chemische Komplementation einer Δ But Mutante mit 100 ng/ml Butenolid. Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B).....	69
Abb. 20: Generierung von Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_08079 mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erhöhten Genexpression <i>in vitro</i>	71
Abb. 21: <i>In planta</i> Expressionsanalyse der Gene des Butenolid-Clusters während der Weizeninfektion von OE_08079 Mutanten und des 8/1_DsRed (5dpi).....	73

Abb. 22: Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B) von Überexpressionsmutanten.....	76
Abb. 23: Überprüfung des <i>in vitro</i> Wachstums auf CM-Agar	77
Abb. 24: Überprüfung der Pathogenität generierter OE_08079 Mutanten auf Weizen des Kultivars „Nandu“	77
Abb. 25: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen	83
Abb. 26: Vergleich der basalen Respiration Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate.....	84
Abb. 27: Vergleich der ATP-gekoppelten Respiration und der Protonendurchlässigkeit Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate.....	85
Abb. 28: Vergleich der maximalen Respiration Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate.....	86
Abb. 29: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate in Weizenvorspelzen, inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante oder H ₂ O, 6dpi.....	87
Abb. 30: Vergleich der basalen Respiration von Weizenvorspelzen inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante oder H ₂ O im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate, 6dpi	88
Abb. 31: Vergleich der ATP-gekoppelten Respiration und der Protonendurchlässigkeit von Weizenvorspelzen, inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante bzw. H ₂ O im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate, 6dpi	89
Abb. 32: Vergleich der maximalen Respiration von Weizenvorspelzen inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante bzw. H ₂ O im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate, 6dpi	90
Abb. 33: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung von Weizenvorspelzen nach 1- (A) bzw. 3-stündiger (B) Inkubation in Wasser oder in 80 µg/ml Butenolid für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	91
Abb. 34: Vorbehandlung von Weizenblüten mit 0,5 ng Butenolid. Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR	92
Abb. 35: Wachstumsversuch von Bakterien und Hefen unter Einfluss von Butenolid.....	93
Abb. 36: Wachstumsversuch von phytopathogenen Pilzen unter Einfluss von Butenolid, 24 hpi	94
Abb. 37: Wachstumsversuch von phytopathogenen Pilzen unter Einfluss von Butenolid, 48 hpi	95
Abb. 38: Untersuchung zur Regeneration von <i>F. graminearum</i> Protoplasten unter Butenolideinfluss	96
Abb. 39: Bestimmung des Wachstums gram-negativer Bakterien unter Einfluss von Aurofusarin-enthaltenen Extrakten	98
Abb. 40: Alignment von Aminosäuresequenzen pilzlicher Cerato-platanin Protein-Homologe	100
Abb. 41: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cerato-Platanin Proteinen (CPP) unterschiedlicher Pilze	101

Abb. 42: Schematische Darstellung der Generierung von Deletionsmutanten des Gens FgCPP1 (FGSG_10212) mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen Deletion	103
Abb. 43: Schematische Darstellung der Generierung von Deletionsmutanten des Gens FgCPP2 (FGSG_11205) in der Δ FgCPP1-1 Mutante mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen doppelten Deletion	104
Abb. 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Infektionsstrukturen auf Weizenvorspelzen der Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP _{1,2} Mutanten sowie des 8/1_DsRed Stammes	106
Abb. 45: Überprüfung der Pathogenität generierter Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP _{1,2} Mutanten auf Weizen des Kultivars „Nandu“	107
Abb. 46: Überprüfung der Sensitivität von Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP _{1,2} Mutanten bzw. des 8/1_DsRed Stammes gegenüber oxidativem und osmotischem Stress	108
Abb. 47: Strukturformeln von Butenolid ^A aus <i>F. graminearum</i> , N-Acylhomoserin Lacton ^B und des Autoinducers-2 ^C und seiner Vorstufe ^C	131
Abb. 48: Strukturformeln von Butenolid ^A aus <i>F. graminearum</i> , Quinat ^B , Schikimisäure ^B und L-Prolin ^B	132
Abb. 49: PCR mit Clusterspezifischen Primern	XII
Abb. 50: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate unbehandelter Weizenvorspelzen	XIII
Abb. 51: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen, 30 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid.....	XIV
Abb. 52: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen, 60 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid.....	XV
Abb. 53: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen, 180 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid.....	XVI
Abb. 54: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Wasser inokulierter Weizenvorspelzen, 6 dpi.....	XVII
Abb. 55: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate von Weizenvorspelzen, inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, 6 dpi	XVIII
Abb. 56: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate von Weizenvorspelzen, inokuliert mit der Δ But-3 Mutante, 6 dpi.	XIX
Abb. 57: Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate von Vorspelzen mit unterschiedlicher Lagerungsdauer	XX

Tabellen

Tab. 1: Verwendete Primer für die Validierung generierter RNA-Sequenzierungsdaten (Transkriptomdaten)	09
Tab. 2: Verwendete Primer zur Klonierung von Deletions-, Überexpressions und Komplementationsplasmide	10
Tab. 3: Verwendete Primer für den Nachweis der Integration von Deletionskonstrukten und der Überexpression von FGSG_08079.....	11

Tab. 4: Verwendete Primer für den Nachweis aller Clustergene des Butenolidclusters und β -Tubulin auf Transkriptionsebene	11
Tab. 5: Verwendete Kits	13
Tab. 6: Verwendete phytopathogene Pilze und deren Wirtspflanzen	14
Tab. 7: Kultivierungsbedingungen verwendeter Bakterien- und Hefestämme	17
Tab. 8: In dieser Arbeit erstellte Mutanten und für die Transformation verwendete Plasmide	25
Tab. 9: Statistische Analyse von Ct-Werten der Haushaltsgene β -Tubulin, Cofilin und Ubiquitin	41
Tab. 10: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid (BUT) in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf die Konzentration an pilzlicher gDNA	45
Tab. 11: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf gemessene gDNA Konzentrationen	48
Tab. 12: Verhältnis von Bandenintensitäten der Butenolid-Clustergene zur Intensität von β -Tubulin Banden innerhalb eines 1,6% Agarosegels	50
Tab. 13: LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf die gemessene Menge pilzlicher gDNA	55
Tab. 14: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf die ermittelte gDNA Konzentration	63
Tab. 15: Bestimmung von DON via LC-MS/MS unter <i>in vitro</i> Induktionsbedingungen ...	65
Tab. 16: Bestimmung von Butenolid via LC-MS/MS unter <i>in vitro</i> Induktionsbedingungen	67
Tab. 17: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf gemessene gDNA Konzentrationen	74
Tab. 18: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf berechnete gDNA Konzentrationen des Pilzes	79
Tab. 19: Bestimmung von DON via LC-MS/MS unter <i>in vitro</i> Induktionsbedingungen ..	80
Tab. 20: Bestimmung von Butenolid via LC-MS/MS unter <i>in vitro</i> Induktionsbedingungen	81
Tab. 21: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf gemessene gDNA Konzentrationen	XX

1. Einleitung

1.1 Der phytopathogene Pilz *Fusarium graminearum*

Der filamentöse Ascomycet *Fusarium graminearum* Schwabe (Teleomorph: *Gibberella zeae* [Schwein.] Petch) ist der Haupterreger der Ährenbleiche (engl. Fusarium Head Blight, FHB) bei Getreidearten wie Weizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) und der Kolbenfäule bei Maispflanzen (*Zea mays*) (McMullen et al., 1997). Die typischen Symptome sind in Abbildung 1 dargestellt. *F. graminearum* wird sowohl als hemibiotropher (Brown et al., 2010), als auch als nekrotropher Pilz klassifiziert und kommt vor allem in den gemäßigten und subtropischen Zonen der Erde vor, wie den USA, Kanada, Australien, Südamerika, China und Zentraleuropa (Schroeder & Christensen, 1963; Bai & Shaner, 1994; McMullen et al., 1997; Nicholson et al., 1998). Nach einem Befall von Wirtspflanzen kann es zu erheblichen Ernteeinbußen und wirtschaftlichen Verlusten kommen (Goswami und Kistler, 2004).

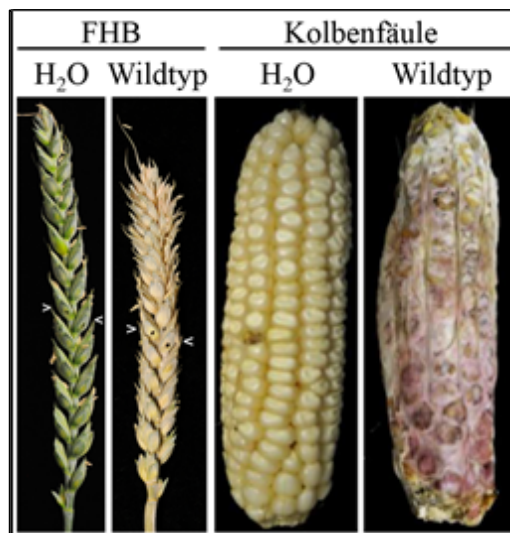


Abb. 1: Schadbilder von FHB auf Weizen (links) und der Kolbenfäule auf Mais (rechts) im Vergleich zu nicht infizierten Pflanzen (H₂O). Bilder der Kolbenfäule wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Ana Lilia Martinez-Rocha (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

F. graminearum überwintert auf infizierten Ernterückständen im Boden. Die Ausbildung von Fruchtkörpern (Perithezien) wird unter feuchten und warmen Witterungsbedingungen initiiert. Innerhalb dieser Perithezien entwickeln sich Asci, die mit Ascosporen (sexuelle Sporen) gefüllt sind (Goswami & Kistler, 2004). Die Verbreitung dieser Sporen erfolgt durch Wind, Wasser oder Insekten, wodurch die Sporen auf die Wirtspflanzen gelangen. Befinden sich im Falle von *T. aestivum* die Blüten im Zustand der Anthesis, wächst *F. graminearum* über die Antheren in die Blüte und bildet dabei Infektionsstrukturen aus (Abb. 2, Boenisch & Schäfer, 2011). Die Ausbreitung auf dem pflanzlichen Gewebe wird durch die Ausbildung von Laufhyphen (RH, engl. runner hyphae) bewerkstelligt. Im nächsten Stadium werden dann sowohl die einzelligen Fußstrukturen (FS), als auch die

verzweigteren gelappten Appressorien (LA; engl. lobate appressoria) ausgebildet. Mit diesen ist der Pilz bereits in der Lage, das Pflanzengewebe zu durchdringen. Durch die weitere Differenzierung entstehen abschließend die stark verzweigten und komplexen Infektionskissen (IC, engl. infection cushion).

Boenisch & Schäfer (2011) konnten zeigen, dass unterhalb der IC mehrere Penetrationsporen zu finden waren. Bereits in dieser frühen Phase konnten Nekrosen beobachtet werden, was für einen nekrotrophen Lebensstil von *F. graminearum* spricht.

Welche molekularen Mechanismen hinter der Initiierung der Ausbildung von Infektionsstrukturen stehen ist bisher noch nicht bekannt. Um diese Mechanismen zu entschlüsseln wurden cDNA Banken von Infektionskissen und Laufhyphen erstellt und mittels Illumina-Sequenzierung eine differentielle Transkriptomanalyse durchgeführt (unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

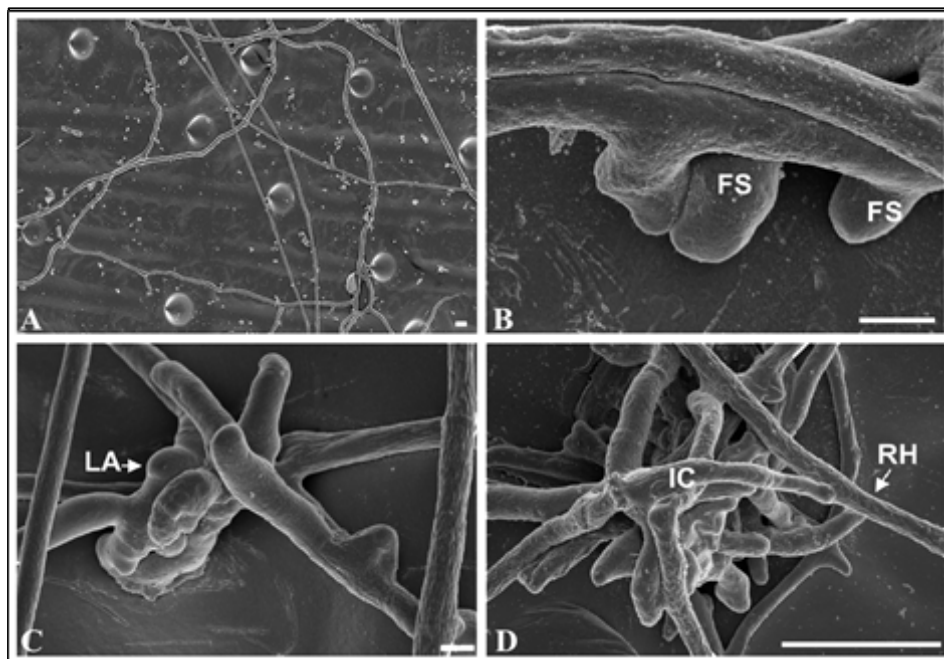


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Infektionsstrukturen von *F. graminearum* auf Weizenhüllspelzen. Die Kolonisierung der Pflanzenoberfläche erfolgt zunächst durch die Ausbildung von wenig verzweigten Hyphen, den Laufhyphen (RH, engl. runner hyphae). Es folgt die Ausbildung von Fußstrukturen (FS) als einzelne Verzweigungen an den RH. Weitere Differenzierungsprozesse führen schließlich zur Bildung von gelappten Appressorien (LA, engl. lobate appressoria) und komplexen, stark verzweigten Infektionskissen (IC, engl. infection cushion). Längenmaßstab: 200 µm. A Zur Verfügung gestellt von Michael Mentges, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg). B-D Verändert nach Boenisch & Schäfer (2011).

Nach der initialen Kolonisierung des Pflanzengewebes einer Blüte breitet sich *F. graminearum* über den Rachisknoten im Leitgewebe einer Weizenähre aus und kolonisiert so die gesamte Ähre. Das letzte Stadium des Lebenszyklus beinhaltet die Bildung asexueller Sporen, der Konidien, auf dem infizierten Pflanzengewebe. Diese werden ebenfalls durch Wind oder Regen verbreitet, wodurch weitere Pflanzen befallen werden können (Gilbert und Fernando, 2004; Paulitz, 1999).

1.2 Sekundärmetabolite von *F. graminearum*

Während der Infektion von Pflanzen produzieren filamentöse Pilze eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten. Hierbei handelt es sich um Moleküle mit geringem Molekulargewicht, die generell nicht für das Wachstum oder für Entwicklungsprozesse des Pilzes notwendig sind, sondern nur in sehr spezifischen Situationen synthetisiert werden (Keller & Shwab, 2008). Enzyme, die an der Synthese eines Metabolits beteiligt sind werden durch Gene kodiert, die sowohl im selben Genabschnitt lokalisiert sind als auch ähnliche Expressionsprofile aufweisen. So definierten Keller und Hohn (1997) Sekundärmetabolit-Cluster.

Diese Cluster enthalten für Enzyme kodierende Gene, die zum einen an der Synthese dieses Metabolits beteiligt sind. Um die Expression dieser Gene zu induzieren, besitzen Gencluster ebenfalls spezifische Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionsfaktor aflR aus *Aspergillus nidulans* reguliert z.B. die Aflatoxin- und Sterigmatocystin-Synthese, indem es palindromische Sequenzen innerhalb der Promotorsequenzen der Clustergene erkennt (Ehrlich et al., 1999; Fernandes et al., 1998; Payne et al., 1998). Des Weiteren besitzen viele Sekundärmetabolitcluster einen spezifischen Transporter, der die Sekretion des Metabolits ermöglicht. Die am häufigsten in Pilzen vorkommenden Transporter gehören zu der Gruppe der „major facilitator superfamily“ (MFS) Transporter (Ren et al., 2007). Ein weiteres Charakteristikum von Sekundärmetabolitclustern ist das Vorhandensein von sogenannten Schlüsselenzymen. Hierzu zählen Polyketidsynthasen, Nicht-ribosomale Proteinsynthasen, Tryptophansynthasen und Di-Methylallyltryptophansynthasen. Sie können in den Clustern verstärkt auftreten und sind für wichtige Syntheseschritte notwendig. Neben diesen Schlüsselenzymen sind Cytochrom P450 Monooxygenasen ebenfalls gute Kandidaten um Sekundärmetabolitcluster zu identifizieren, da sie ebenfalls wichtige Funktionen in unterschiedlichen Synthesewegen einnehmen (Pusztahelyi et al., 2015).

Für *F. graminearum* konnten durch die Arbeit von Sieber et al. (2014) 67 mögliche Sekundärmetabolit-Cluster und dazugehörige Gene identifiziert und dadurch ebenfalls bereits bekannte Cluster validiert werden. Hierfür wurden 12 unterschiedliche Microarray Expressionsdatensätze verglichen, um die Ko-Regulation putativer Clustergene zu überprüfen. Bisher sind die Metabolite von 12 dieser 67 möglichen Cluster bekannt. Nachfolgend werden drei der bekannten Metabolite näher erläutert.

1.2.1 Deoxynivalenol (DON)

Einige Metabolite wirken toxisch auf Tiere und Menschen, wenn sie über kontaminiertes Getreide aufgenommen werden. Eines dieser Toxine ist das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) von *F. graminearum*. DON gehört zur Gruppe der Trichothecene. Es inhibiert die Proteinsynthese an den Ribosomen (Rocha et al., 2005). Neben der toxischen Wirkung auf Menschen und Tiere ist DON ein wichtiger Virulenzfaktor für die Infektion von Weizen. Die Deletion des ersten Gens der DON-Biosynthese, einer Trichodien-Synthase (FgTRI5; Hohn & Beremand, 1989), führt zu Mutanten die in der Synthese von DON gestört sind (Proctor et al. 1995) und nur noch eine inokulierte Weizenblüte infizieren können. Die Ausbreitung über den Rachisknoten dieser Blüte in die Leitgewebe der Weizenähre kann nicht mehr erfolgen (Proctor et al. 1995, Maier et al. 2006). Dass DON bereits in der frühen Infektionsphase produziert wird konnte von Boenisch und Schäfer (2011) gezeigt werden.

Unter Verwendung eines Reporterstammes wurde die Induktion der DON-Synthese bereits bei der Ausbildung von Infektionsstrukturen, wie den Infektionskissen, beobachtet. Da DON defiziente Mutanten jedoch ebenfalls in der Lage sind, diese Strukturen auszubilden und mit ihnen pflanzliches Gewebe durchdringen können, scheint DON weder an der Ausbildung von Infektionskissen, noch am Penetrationsprozess ursächlich beteiligt zu sein. Die Erhöhung der DON-Biosynthese konnte ebenfalls bewerkstelligt werden. Durch die Deletion zweier negativer Regulatoren war es Gardiner et al. (2009) möglich, die DON-Synthese während der Infektion zu erhöhen. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Virulenz dieser Mutanten beobachtet werden. Eine GC-MS Analyse von Kulturüberständen dieser Mutanten unter Sekundärmetabolit-induzierenden Bedingungen hat jedoch gezeigt, dass sich die Chromatogramme im Vergleich zum Wildtyp unterschieden. Die Deletionen führten sowohl zur Akkumulation, als auch zum Verlust von einzelnen anderen Metaboliten.

1.2.2 Aurofusarin

Ein weiteres bekanntes Sekundärmetabolit von *F. graminearum* ist das Polyketid Aurofusarin. Polyketide gehören zu einer großen und sehr diversen Gruppe der Sekundärmetabolite und sind sowohl in Bakterien als auch in Mammalia vertreten (Hranueli et al., 2001). Polyketide können sowohl als Pigmente (Butler et al., 2001), als auch als Toxine (Yang et al., 1996) und Antibiotika (Walsh, 2004) agieren. 2005 haben Malz et al. sowohl den Aufbau eines Genclusters identifiziert, das für die Synthese von Aurofusarin zuständig ist, als auch durch die Deletion der Cluster-internen Polyketidsynthase 12 (FgPKS12), die Synthese unterbrochen. Bei diesem Polyketid handelt es sich um ein rotes Pigment, welches sowohl von *F. graminearum* und anderen *Fusarium* Arten während des *in vitro* Wachstums produziert wird. Doch auch in infizierten Weizenähren konnten Aurofusarin-Konzentrationen von 4,2 mg/kg nachgewiesen werden (Kotik & Trufanova, 1998). Nichtsdestotrotz sind Aurofusarin-defiziente Mutanten in der Lage, die komplette Weizenähre zu befallen (Malz et al., 2005). Somit ist dieses Metabolit nicht entscheidend für eine erfolgreiche Infektion durch *F. graminearum*. Ein weiteres rotes Pigment ist das Polyketid Bikaverin aus *F. lycopersici*, *F. oxysporum* und *Gibberella fujikuroi* (Kreitmann & Nord, 1949; Cornforth et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002). Mehrere Studien haben ergeben, dass es sowohl antiprotozoale, als auch antifungale Eigenschaften besitzt (Kjær et al., 1971; Cornforth et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002). Auf andere Pilze hingegen wirkt es seneszent (Cornworth et al., 1971). Im Rahmen einer Dissertation wurde Aurofusarin hingehend bioaktiver Eigenschaften untersucht (Malz, 2004). Hierbei zeigte sich, dass sowohl gram-negative Bakterien, als auch Hefen im Wachstum gehemmt werden, wenn sie mit einem Aurofusarin-enthaltenen Extrakt versetzt werden. Das Wachstum des phytopathogenen Pilzes *Pyrenophora teres* konnte vollständig unterbunden werden.

Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass 7 Tage nach der Inokulation kein Transkript von FgPKS12 nachweisbar war. Die Analyse von Transkriptomdaten aus Laufhyphen und Infektionskissen von *F. graminearum* haben jedoch gezeigt, dass das Aurofusarin Synthesecuster in Laufhyphen stark exprimiert wird und Aurofusarin somit in der frühen Infektionsphase synthetisiert wird (unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg). Zusammen mit der antimikrobiellen Wirkung von Aurofusarin könnte die Funktion dieses Polyketids in der Hemmung von Antagonisten in der frühen Infektionsphase liegen.

1.2.3 Butenolid

Das letzte Sekundärmetabolit, das näher erläutert werden soll, ist das Butenolid aus *F. graminearum*. Es wurde erstmals 1967 von Yates et al. aus infiziertem Rohrschwengel (*Festuca arundinacea* Schreb.) isoliert und wurde seither in mehreren Studien als toxisch für Tiere nachgewiesen (Feron et al., 1979; Bhavanishankar et al., 1988; Vesonder et al., 1993). Es steht außerdem im Verdacht die Keshan-Krankheit auszulösen, eine Erkrankung des Herzmuskels (Zhao et al., 1993; Zhang et al., 1995).

Weitere Studien ergaben, dass die Mitochondrien des Muskelgewebes beeinträchtigt werden. Es kommt u.a. zur Schwellung der Mitochondrien, Unterbrechung der Doppelmembran und zur Störung der mitochondrialen Atmung (Li et al., 1992; Wang et al., 2009, 2007; Yang 1992, 2006). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die Behandlung von HepG2 Zellen mit Butenolid zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies führt (Wang et al., 2006). Ob pflanzliche Mitochondrien ebenfalls durch Butenolid beeinflusst werden wurde bislang noch nicht näher untersucht.

Über die Funktion des Butenolids während der Infektion von Weizen durch *F. graminearum* ist sehr wenig bekannt. 2006 wurden von Harris et al. die Gene des Clusters identifiziert, die für die Synthese von Butenolid zuständig sind. Das Gencluster setzt sich aus acht ko-regulierten Genen zusammen die alle unter Mykotoxin-induzierenden Bedingungen auf Transkriptionsebene nachgewiesen wurden. Auch *in planta* konnten die Expression der acht Gene in der frühen Infektionsphase von Gerste und Weizen nachgewiesen werden (Güldener et al., 2006, Sieber et al., 2014).

Durch die Deletion des Clustergens FGSG_08079, eine Cytochrom P450 Monooxygenase, konnte die Butenolid-Synthese unterbunden werden (Harris et al., 2006). Infektionsstudien auf Weizen haben allerdings ergeben, dass die Mutanten ebenso virulent waren wie der verwendete Wildtyp. Beide verursachten das typische Ausbleichen der Ähren nach 21 Tagen. Für die Ausbreitung innerhalb der Weizenähre wird Butenolid demnach nicht benötigt. Obwohl mittlerweile bekannt ist, dass das Cluster bereits in der frühen Infektionsphase aktiv ist, gibt es keine Studien, die den Nachweis von Butenolid zu diesem Zeitpunkt erbringen oder die Funktion von Butenolid in der frühen Infektionsphase analysieren. Durch die Analyse von Transkriptomdaten konnte jedoch ermittelt werden, dass das Butenolid Synthesecuster weder in Laufhyphen, noch in Infektionskissen aktiv ist, da für die Gene entweder nur sehr wenig oder gar kein Transkript nachweisbar war. Eine hohe Expression der Clustergene konnte allerdings innerhalb des infizierten Pflanzengewebes nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

1.3 Mitochondriale Energieerzeugung in Pflanzen

Im Zuge der Pathogenabwehr nehmen Mitochondrien in Pflanzen eine aktive Rolle ein, wie z.B. die frühe Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. **reactive oxygen species**, ROS) im Zuge der hypersensitiven Reaktion (HR, engl. **hypersensitive response**) (Ashtamker et al., 2007). Die Bildung von ROS steht in engem Zusammenhang mit der Elektronentransportkette (ETC, engl. **electron transport chain**) innerhalb der Mitochondrien (Colombatti et al., 2014).

Die ETC setzt sich aus fünf Komplexe zusammen, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Die Komplexe I, III und IV pumpen Protonen aus der Matrix des Mitochondriums in den Intermembranraum. Der dadurch erzeugte Potentialgradient generiert beim Rückstrom durch die ATP-Synthase (Komplex V) ATP. Neben der Komplex I NADH Dehydrogenase konnten weitere NADH Dehydrogenasen in der inneren Mitochondrienmembran (IMM) identifiziert werden. Kommt es zu einer Störung dieses Prozesses z.B. durch die Inhibierung eines Komplexes, wird die ETC unterbrochen und Elektronen direkt auf O_2 übertragen (Møller, 2001), wodurch es zur Bildung von O_2^- kommt. Um die Bildung von ROS zu reduzieren, werden alternative Prozesse, wie die Aktivität einer alternativen Oxidase, induziert. Die alternative Oxidase (AOX; Elthon & McIntosh, 1987) koppelt die Oxidation von Ubichinon (Q) an die Reduktion von O_2 zu H_2O , übernimmt also die Rolle des Komplexes IV, und überbrückt so die Komplexe III und IV (s. Abb. 3). Die Aktivität der AOX reduziert jedoch die Energieausbeute, da keine Protonen mehr durch die Komplexe III und IV in den Intermembranraum transloziert werden. Der dadurch reduzierte Rückstrom der Protonen durch die ATP-Synthase führt zu einer Einschränkung in der ATP-Synthese.

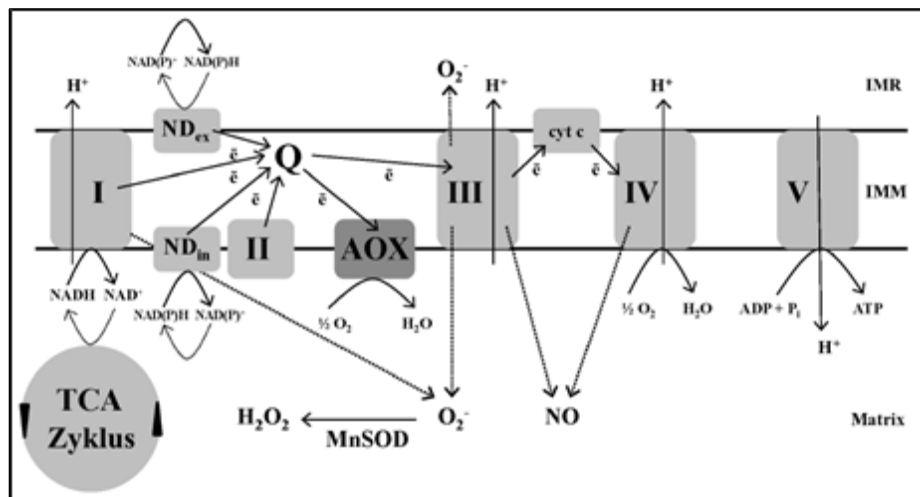


Abb. 3: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette in Pflanzen. Durch die Komplexe I, III und IV werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum (IMR) gepumpt. Der so erzeugte Protonengradient wird im Komplex V zur Generierung von ATP durch den Rückstrom der Protonen eingesetzt. Der Elektronenfluss findet dabei von Komplex I und II auf Ubiquinon statt (Q) und von dort aus weiter zum Komplex III und anschließend zum Komplex IV. Die Alternative Oxidase (AOX) ermöglicht es, Elektronen vom Ubiquinon direkt auf Sauerstoff zu übertragen. Die AOX abhängige Atmung überbrückt die Komplexe III und IV. Komplex II ist im Metabolismus von Succinat im TCA-Zyklus beteiligt und ein weiterer Lieferant von Elektronen. Verändert nach Vanlerberghe (2013)

Welche Rolle die pflanzliche AOX während eines Pathogenbefalls spielt, ist bisher noch nicht geklärt worden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Respiration und die Mitochondrienaktivität während der Infektion mit phytopathogenen Pilzen ansteigen (Norman et al., 1994; Naton, et al., 1996, Scharte et al., 2005).

Neben der indirekten Rolle der Mitochondrien innerhalb der Pathogenabwehr stellen Mitochondrien direkte Angriffsziele von Sekundärmetaboliten dar, wie es am Beispiel des T-Toxins aus *Cochliobolus heterostrophus* gezeigt werden konnte. Durch die Interaktion dieses Toxins mit dem Protein URF13, das an der IMM von Maismitochondrien lokalisiert

ist, kommt es zur Porenbildung und somit zur Destabilisierung der Mitochondrien (Walton, 1996). Ob *F. graminearum* während der Infektion von Weizen ein Sekundärmetabolit produziert, das die Aktivität von Mitochondrien beeinflusst ist bisher noch nicht untersucht worden. Die Beeinträchtigung von tierischen Mitochondrien durch Butenolid könnte hierbei jedoch ein Hinweis auf eine mögliche Wirkung dieses Metabolits auf Pflanzenmitochondrien sein.

1.4 Cerato-platanine

Neben der Sekretion von Sekundärmetaboliten, die für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes unerlässlich sein können, werden während der Wirt-Pathogen-Interaktion ebenfalls Proteine sekretiert, die die Etablierung der Infektion und die Ausbreitung innerhalb der Pflanze regulieren können (Wosten, 2001).

Ceratocystis platani ist der Haupterreger der Platanenwelke in *Platanus acerifolia* (Pazzagli et al., 1999). Es synthetisiert ein phytotoxisches Protein, das Cerato-platanin (CP), welches namensgebend für die Proteinfamilie der Cerato-platan Proteine (CPP) ist und nur in filamentösen Pilzen vorkommt (Chen et al., 2013). CPPs besitzen, neben der CPP-Domäne, vier konservierte Cysteinreste und sind 120 bis 140 Aminosäuren lang. Des Weiteren liegt ein Signalpeptid zur Sekretion dieser Proteine vor. Tatsächlich können die Proteine im Kulturmedium von Pilzen nachgewiesen werden (Pazzagli et al., 2014). De Oliveira et al. (2011) konnten jedoch ebenfalls zeigen, dass CPP in der Lage sind, an N-Acetylglucosamin und Chitin zu binden, was für die Beteiligung am Wachstum und an der Differenzierung des Pilzes spricht. Die Spaltung von Cellulose wurde ebenfalls beschrieben (Bacelli et al., 2014; Pazzagli et al., 2014). Es besteht also die Möglichkeit, dass CPP ebenfalls eine Rolle in der Wirt-Pathogen-Interaktion spielen, indem sie z.B. während der Infektion die pflanzliche Zellwand abbauen und somit das Eindringen pilzlicher Hyphen fördern (Pazzagli et al., 2014). Sowohl für das CPP Homolog in *Magnaporthe grisea*, MSP1, als auch für das CPP aus *Botrytis cinerea*, BcSpl1, wurde gezeigt, dass diese für die Virulenz verantwortlich sind. Die Δ MSP1 Mutanten erzeugten weniger und kleinere Läsionen auf Gerstenblättern und waren im Wachstum innerhalb des Gewebes beeinträchtigt (Jeong et al., 2007). Informationen über die Expression dieses Gens unter verschiedenen Bedingungen lagen nicht vor. Anders verhält es sich mit BcSpl1. Dieses Protein war eines der meist-sekretierten Proteine unter Bedingungen, die eine Pflanzeninfektion vortäuschen (Espino et al., 2010). Die Verwendung von Pflanzenextrakten führte ebenfalls zu einer starken Induktion (Shah et al., 2009). Frías et al. (2011) konnten dann nachweisen, dass die Deletion von BcSpl1 zu einer reduzierten Virulenz auf mehreren Wirtspflanzen führt.

Im Genom von *F. graminearum* konnten fünf Gene mit einer CPP Domäne identifiziert werden. Zwei dieser fünf Proteine, FgCPP1 (FGSG_10212) und FgCPP2 (FGSG_11205), konnten im Zuge einer Proteomanalyse von infizierten Weizenblüten nachgewiesen werden (Paper et al. 2007). Durch eine von Lysøe et al. (2011) durchgeführte Transkriptomanalyse konnten Transkripte dieser beiden CPP in der frühen Infektionsphase von Weizen detektiert werden. Im Zuge der Charakterisierung von FgCPP1 und FgCPP2 erstellten Quarantin et al. (2016) Einzel- und Doppelmutanten dieser Gene. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten anfälliger für Chitinasen und β -1,3-Glucanasen waren. Die Behandlung führte zu

einem reduzierten Wachstum der Mutanten und deutet auf eine Rolle dieser Proteine in der Stabilität bzw. den Schutz der pilzlichen Zellwand.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte zum einen überprüft werden, ob Expressionsprofile einer Illumina-Sequenzierung von cDNA Banken aus Infektionsstrukturen des Pilzes *F. graminearum* und einer axenischen Kultur mit der Methode der qRT-PCR reproduziert und somit validiert werden können.

Eine erfolgreiche Infektion von Weizen durch *F. graminearum* hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Bislang gibt es kaum Studien, die sich mit der initialen Infektion beschäftigen, obwohl die Aufklärung der dahinterstehenden Mechanismen neue Ansätze für die Bekämpfung dieses Pathogens liefern könnte. Ziel dieser Arbeit war deshalb, die Rolle der Sekundärmetabolite DON, Butenolid und Aurofusarin in der frühen Infektionsphase von *F. graminearum* näher zu untersuchen. Von DON ist bisher bekannt, dass es für die Ausbreitung innerhalb einer Weizenähre unerlässlich ist (Proctor et al. 1995, Maier et al. 2006). Um die weitere Bedeutung dieser Metabolite für die frühe Infektionsphase zu entschlüsseln, wurden Null-Mutanten erstellt und diese eingehend untersucht. Neben den Auswirkungen auf den frühen Infektionsverlauf sollten ebenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften von Butenolid und Aurofusarin näher betrachtet werden. Im Falle von Butenolid ist dessen störende Wirkung auf die mitochondriale Atmung in Herzmuskelgewebe bereits bekannt (Wang et al., 2009). In Bezug auf die Pflanzeninfektion sollte daher ebenfalls der Einfluss von Butenolid auf die mitochondriale Atmung von Weizenvorspelzen untersucht werden um so ein mögliches Angriffsziel zu identifizieren.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Cerato-platanin Proteinen (CPP) aus *F. graminearum*. In *M. grisea* und *B. cinerea* stellen CPP Virulenzfaktoren dar. Es sollte aus diesem Grunde überprüft werden, ob CPPs in *F. graminearum* ebenfalls als Virulenzfaktoren fungieren und, ob sie möglicherweise für die initiale Infektion entscheidend sind. Hierfür wurden zunächst fünf Gene, die für mögliche CPP kodierten, durch *in silico* Analysen und Sequenzvergleiche analysiert um Homologe zu bereits bekannten CPP identifizieren zu können. Erstellte Deletionsmutanten wurden hingehend ihrer Funktion während der Infektion von Weizen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Laborchemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ und stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Metabion (Martinsried), Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

Die Agarose für die Gelelektrophorese stammte von der Firma Biozym. Alle verwendeten Medien und Puffer wurden selber und mit deionisiertem Wasser (ddH₂O) aus der Ionentauscheranlage (MilliQ, Millipore) angesetzt und werden zu Beginn des jeweiligen Methodenteils aufgeführt.

Das synthetisch hergestellte und in dieser Arbeit verwendete Butenolid (5-Acetamido-Butenolide, CAS-Nr. 16275-44-8) wurde von der Firma Cfm Oskar Tropitzsch GmbH bezogen.

2.1.2 Enzyme

Für die Amplifikation unterschiedlicher Fragmente und analytische PCR's wurde der OneTaq-Mix (New England BioLabs) verwendet. Die Amplifikation des Gens FGSG_08079 für die Erstellung eines Überexpressionsplasmids erfolgte mit der Q5-Polymerase (New England BioLabs). Für die Ligation (2.2.5.2) wurde eine T4-DNA-Ligase (New England BioLabs) benutzt. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs oder Thermo Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bezogen.

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die *in silico* Erstellung der Primer erfolgte mit der Software PerlPrimer (v1.1.21, Marshall, O.J. (2004)). In den folgenden Tabellen sind alle verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Eine Beschreibung der Anwendung der jeweils verwendeten Primer ist im Methodenteil wiederzufinden. Die Annealingtemperatur lag zwischen 58 und 60 °C.

Tab. 1: Verwendete Primer für die Validierung generierter RNA-Sequenzierungsdaten (Transkriptomdaten)

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Orientierung)	Beschreibung
AGL_qRT-tri5_fw	TTTTTGAGGGATGCTGGATTGA	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-tri5_rv	GCCATAGAGAAGCCCCAACAC	FGSG_03537; FgTRI5
AGL_qRT-pks12_fw	AACTGTCATCAGACTACGCC	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-pks12_rv	TATGTCTCCATAAACACCAACC	FGSG_02324; FgPKS12
JB_05554_gta1_fw	CAAGACCAAGAGCCACATGG	qRT-PCR Primer für
JB_05554_gta1_rev	AATCTGAGCGAAGACGTCGA	FGSG_05554; FgGTA1

JB_06751_gta2_fw	CTTCTTTCACCGAGAACGCC	qRT-PCR Primer für
JB_06751_gta2_rev	ATCGACGATGTAGTTATCGTGAG	FGSG_06751; FgGTA2
10F- FgEF1	CTACAACGTCCAGAAGAGCAC	qRT-PCR Primer für für
11R- FgEF1	CTGCGCGCATCTCGAGAAC	FGSG_04213; FgEF1
Fg_6245_fw	TGGTATCCGAAACAAGATCACCT	qRT-PCR Primer für
Fg_6245_rev	GTCGTATTTCGATGTCATCAGTGTC	FGSG_06245; Cofilin; Haushaltsgen I
Fg_10805_fw	CTTCACTACACGCATCTACC	qRT-PCR Primer für
Fg_10805_rev	GGACAGAAGAACTTTAGAGATGG	FGSG_10805; Ubiquitin; Haushaltsgen II

Tab. 2: Verwendete Primer zur Klonierung von Deletions-, Überexpressions- und Komplementationsplasmide. Großgeschriebene Sequenzen kennzeichnen Überhänge, die für die Hefe-Rekombinationsklonierung benötigt werden. Kursive Sequenzen stehen für Restriktionsschnittstellen.

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Orientierung)	Beschreibung
AG_LFnew08079_fw	CCCCCCTCGAGGTCGACGGTATC GATaatagtaatgtagggcgatagg	Primer zur Amplifikation der linken flankierenden Region von FGSG_08079.
AG_LFnew08079_rev	TGAGCATGCCCTGCCCTGAGCGG CCggttagcatatacacaactacca	Überhang zu pRS426 (fw) und der Nourseothricin- Resistenzkassette (Nat ^R).
AG_RFnew08079_fw	GAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGT AGctcggtttgtcgtaacgaa	Primer zur Amplifikation der rechten flankierenden Region von FGSG_08079.
AG18_RF_08079_rev	GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCG Gcggacgtaagggttcggactgt	Überhang zu pRS426 (rev) und Nat ^R (fw).
AGL_But-OE_fw	<i>ggatcc</i> ATGGCCATGTTCACTGTC	Amplifikation der FGSG_08079 Gensequenz, <i>Bam</i> HI Schnittstelle zur Klonierung
AGL_But-OE_rev	<i>ggatcc</i> CTACATCCGACGTCTAATTC	
AGL_But-Komp_fw	CCCCCCTCGAGGTCGACGGTATC GATaattagataggacaaactcac	Amplifikation des gesamten FGSG_08079 ORF inkl. nativen Promotor für die Komplementation. Fw
AGL_ButKomp_Nrev	TACATCACCCACCTCGCTCC ctacatccgacgtctaattc	Überhang zum pRS426, Rev-Überhang zur Hygromycin- Resistenzkassette
AGL_KompFL_Nfw	CGACCGAACAAGAGCTGTCC ggtttgatagggactctgtactt	Flankierende Region hinter FGSG_08079 ORF. Fw
AGL_KompFL_rev	GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCG Gggatatctgattcaatgtgttg	Überhang zu Hyg ^R , Rev- Überhang zum pRS426
Hyg_fw	ggagcgaggtgggtgatgtagc	Amplifizierung der Hyg ^R
Hyg_rev	ggacagctctgttcgggtcgg	

AG3_LF_FgSp1_fw	CCCCCCTCGAGGTCGACGGTATC GATcttagaggccgagcagaataac	Primer zur Amplifikation der linken flankierenden Region von FGSG_10212. Überhang zu pRS426 (fw) und der HygB.
AG4_LF_FgSP1_rv	TACATCACCCACCTCGCTCCgctaccc tgccttgccatca	
AG5_RF_FgSP1_fw	CGACCGAACAAGAGCTGTCCtgctctg cttgatcgaattgga	Primer zur Amplifikation der rechten flankierenden Region von FGSG_10212. Überhang zu pRS426 (rev) und HygB (fw).
AG6_RF_FgSP1_rv	GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCG Ggggtgtgcctagtcagagcttg	
AG9_LF_FgSp2_fw	CCCCCCTCGAGGTCGACGGTATC GATtcagcggagatacagaaggta	Primer zur Amplifikation der linken flankierenden Region von FGSG_11205. Überhang zu pRS426 (fw) und der Nat ^R .
AG10_LF_FgSP2_rv	TGAGCATGCCCTGCCCTGAGCGG CCtttagtcaagaacgtggctgg	
AG11_RF_FgSP2_fw	GAATCGGGAATGCGGCTCTAGAGT AGgtaaccaacaactgctgacac	Primer zur Amplifikation der rechten flankierenden Region von FGSG_11205. Überhang zu pRS426 (rev) und Nat ^R (fw).
AG12_RF_FgSP2_rv	GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCG Gtcgttaaacgcctggactatg	

Tab. 3: Verwendete Primer für den Nachweis der Integration von Deletionskonstrukten und der Überexpression von FGSG_08079.

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Orientierung)	Beschreibung
AGL_qRT-08079_fw	TCAGCATCCCAATCTACACT	Interne Primer FGSG_08079
AGL_qRT-08079_rev	AGTGATAACCTTGAGTTCCATCT	
JB_06611_fw	CGCATACCACGGAACCTTCAG	Interne Primer β -Tubulin; Haushaltsgen qRT-PCR, Quantifizierung von Pilzmaterial
JB_06611_rev	TCAAGATCGACCAGAACAGCA	
AGL_qRT-Tub_fw	TTCAGACCAAGAACTCCGAG	Interne Primer β -Tubulin; Größeres Fragment für RT-PCR
AGL_qRT-Tub_rev	GTACCAATGCAAGAAAGCCT	
AG1_Int_FgSP1_fw	ACTCTCACCCTACCACCAACA	Interne Primer FGSG_10212
AG2_Int_FgSP1_rv	GGGCGTTCATGGCATCGAGG	
AG7_Int_FgSP2_fw	ACCAACCTCTTCTGTCTCGCC	Interne Primer FGSG_11205
AG8_Int_FgSP2_rv	GAGTAGCAGTCGCATCAACCC	

Tab. 4: Verwendete Primer für den Nachweis aller Clustergene des Butenolidclusters und β -Tubulin auf Transkriptionsebene

Primerbezeichnung	Sequenz (5'-3' Orientierung)	Beschreibung
AGL_qRT-08077_fw	GGAAGTCAAGAATGACTTTCTGG	qRT-PCR Primer für Fgsg_08077
AGL_qRT-08077_rv	ATGATCTCCAAGACGACTCTG	
AGL_qRT-08078_fw	CCCTACGATAAGCCAAACCA	qRT-PCR Primer für Fgsg_08078
AGL_qRT-08078_rv	CACGAAGTAAGTCATCCATAACTG	
AGL_qRT08079_fwN	CATGATCAACCTGCGTACTC	qRT-PCR Primer für Fgsg_08079
AGL_qRT08079_rvN	TGCTACTCGTAGTATCAGTTCC	

AGL_qRT-08080_fwN	GTTTGTTATCCCGTCACCGA	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-08080_revN	CGCTTGTCTTCTTTACCAC	Fgsg_08080
AGL_qRT-08081_fw	AATCAGATCATCGTCAACGTC	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-08081_rev	CTTAGCATTGACTCATCCTC	Fgsg_08081
AGL_qRT-08082_fw	ATTTGGATACCTAACCGATGTG	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-08082_rev	GTCAAACCTCCCTGTAGTCCT	Fgsg_08082
AGL_qRT-08083_fwN	GGTTATCTCTTCCACGACGA	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-08083_revN	GAGAAACATCTTGGTAGCGT	Fgsg_08083
AGL_qRT-08084_fw	CAAATCACTATGCCGATACCT	qRT-PCR Primer für
AGL_qRT-08084_rev	TAAGCATGAAATCCCAGCAG	Fgsg_08084
AGL_qRT-Tub_fw	TTCAGACCAAGAACTCCGAG	Interne Primer β -Tubulin;
AGL_qRT-Tub_rev	GTACCAATGCAAGAAAGCCT	Größeres Fragment für RT-PCR
Fg06611_fw	CGCATACCACGGAACCTTCAG	Interne Primer β -Tubulin;
Fg06611_rev	TCAAGATCGACCAGAACAGCA	Haushaltsgen qRT-PCR, Quantifizierung von Pilzmaterial
JBGScreenfw	GTTGTATCTGTGACCCTTGTTGAG	Überprüfung von cDNA auf
JBGScreenrev	GATGTCGTTGCCTTCCTCCT	gDNA Kontamination

2.1.4 Molekulargewichtsstandards

Für die Nukleinsäure-Gelelektrophorese (2.2.4) wurden die Molekulargewichtsstandards GeneRuler1kb Plus DNA Ladder, GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot) und 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs) verwendet. Für die Southern Blot Analysen wurde der DNA Molecular Weight Marker VII, DIG labeled (Roche) verwendet.

2.1.5 Vektoren

Für die Klonierung von Deletions- und Komplementationsplasmiden wurde der Vektor pRS426 (Christianson et al., 1992) verwendet. Die Erstellung des Überexpressionsplasmids erfolgte mit dem Vektor pJet1.2/blunt (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für die Zwischenklonierung und dem pAN7.1/GluA (Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg). Für die Amplifikation der Hygromycin Resistenzkassette wurde der pGEM-T-Hyg Vektor als Template verwendet (Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

2.1.6 Verwendete Kits

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgelistet.

Tab. 5: Verwendete Kits

Name	Verwendung
Nucleic Acid and Protein Purification NucleoBond Xtra Mini/Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)	Mini/Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>
Nucleospin Extract II PCR Clean-up Gel- Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)	Aufreinigung von PCR Produkten und DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel
peqGOLD TriFast (Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland)	Isolierung von Gesamt-RNA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)	cDNA Synthese
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)	Quantitative Real Time PCR
Ridascreen®FAST DON (r-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland)	DON Quantifizierung

2.1.7 Verwendete Organismen

Fusarium graminearum Stämme

Alle in dieser Doktorarbeit erstellen Mutanten basieren auf dem *F. graminearum* Stamm 8/1_DsRed (interne Transformationsnr.: 1526.4.4). Hierbei handelt es sich um den Wildtyp-Stamm 8/1, in den durch Protoplasten-Transformation das Gen für das rot fluoreszierende Protein DsRed zusammen mit einer Geneticin-Resistenz integriert wurde. Pathogenitätstests haben gezeigt, dass sich der 8/1_DsRed Stamm wie der Wildtyp-Stamm verhält. Aus diesem Grund dient dieser Stamm im weiteren Verlauf der Arbeit als Referenzstamm. Für den Wachstumsversuch mit Butenolid wurde der 8/1_GFP Stamm als Referenzstamm verwendet (interne Transformationsnr.: 600.25.1). Hier wurde durch Protoplasten-Transformation das grün fluoreszierende Protein GFP (engl. **g**reen **f**luorescent **p**rotein) zusammen mit einer Hygromycin-Resistenz in das Genom des 8/1 Wildtyps integriert. Dieser Stamm verhält sich ebenfalls wie der untransformierte Wildtyp. Weitere in dieser Arbeit verwendete *F. graminearum* Stämme sind der Δ Tri5_GFP Stamm (interne Transformationsnr.: 600.11.1), welcher ebenfalls konstitutiv GFP exprimiert und zusätzlich eine Deletion des Tri5 Gens besitzt.

Andere phytopathogene Pilze

Für die Wachstumsversuche mit Butenolid wurden ebenfalls nachfolgend aufgelistete phytopathogene Pilze verwendet. Jeder dieser Pilze beinhaltet das Gen für das grün fluoreszierende Protein GFP. Bei -70 °C gelagerte Konidien wurden von Dr. Martin Gand

und Sophie Charlotte Brandt (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) für die Testungen zur Verfügung gestellt.

Tab. 6: Verwendete phytopathogene Pilze und deren Wirtspflanzen

Pilz	Wirtspflanzen
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Reis, Weizen, Roggen, Gerste, Perlhirse
<i>Fusarium oxysporum</i>	Getreide
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	Banane
<i>Stagonospora nodorum</i>	Weizen

Bakterien und Hefen

Für die Transformation von Plasmiden wurden kompetente *E. coli* (One Shot® OmniMAX™, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) verwendet. Die Rekombinationsklonierung fand im *Saccharomyces cerevisiae* Stamm FV834 statt. Des Weiteren wurden folgende weitere Bakterien und Hefen für Wachstumsassays mit Butenolid verwendet:

- *Bacillus subtilis*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Micrococcus aureus*
- *Rhizobium* sp. NG234
- *Janthino HH102*
- *S. cerevisiae*

Alle Bakterien- und Hefestämme wurden als Kryokulturen mit 10% Glycerol bei -70 °C gelagert. Die Bakterien *B. subtilis* und *M. aureus* und die Hefe *S. cerevisiae* wurden von Prof. Dr. Wilhelm Schäfer (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) für die Testungen zur Verfügung gestellt. Die Bakterienstämme *P. fluorescens*, *Rhizobium* sp. NG234 und *Janthino HH102* wurden von Prof. Dr. Wolfgang Streit (AG Mikrobiologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) für die Testungen zur Verfügung gestellt.

Die Wachstumsversuche mit extrahiertem Aurofusarin wurden mit den gram-negativen Bakterien *P. fluorescens*, *Rhizobium* sp. NG234 und *Janthino HH102* durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 *in silico* Analysen

Für die Bestimmung von Bandenintensitäten innerhalb eines Agarosegelbildes wurde das Programm „ImageJ“ (Schneider et al., 2012) verwendet. Hierfür wurden gleichgroße Bereiche pro Bande für die Intensitätsbestimmung verwendet. Ermittelte Intensitäten wurden auf die der β -Tubulin Bande bezogen und so das Verhältnis berechnet.

Die Analyse von Proteinsequenzen fand mit den Online-Tools „SignalP“ (Petersen et al., 2011), „SMART analysis tool“ (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2014), „MotifScan“ (MyHits, SIB, Switzerland) und „TargetP“ (Emanuelsson et al., 2000) statt. Das Alignment von Sequenzen und die Sequenzhomologie wurde mit der ClustalX(2.1) Software durchgeführt und konservierte Regionen mittels GeneDoc bestimmt.

2.2.2 Kultivierungsbedingungen

Filamentöse Pilze

Komplettmedium	10 ml Lösung A (1 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, Sterilfiltrat)
(Leach et al., 1982)	10 ml Lösung B (200 mg/l KH_2PO_4 , 250 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$,
(CM, engl.	150 mg/l NaCl, Sterilfiltrat)
<u>c</u> omplete <u>m</u> edia)	1 ml MNS (60 mg/l H_3BO_3 , 390 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 13 mg/l KI, 60 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 50,6 mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 5480 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 932 mg/l $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, steril durch 2ml/l Chloroform)
	10 g Glukose
	2 g Hefeextrakt-Casein-Mix

Mit sterilem ddH₂O auf 1 l auffüllen. Für einen CM-Agar wurden 16 g/l Agar hinzugefügt.

CM-Selektionsagar: CM-Agar mit 100 µg/ml Hygromycin, Nourseothricin und/oder Geneticin

SNA-Agarplatten	1 g KH_2PO_4
(Nirenberg, 1981)	1 g KNO_3
(engl. <u>S</u> ynthetic	0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
<u>N</u> utrient Poor <u>A</u> gar)	0,5 g KCl
	0,2 g Glukose
	0,2 g Saccharose
	20 g Agar

in 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren.

Minimalmedium

Das Minimalmedium (MM) setzt sich aus allen Komponenten des Komplettmediums (CM) mit Ausnahme des Hefeextrakt-Casein-Mixes zusammen.

Modified MYRO,	3g KH_2PO_4
(Harris et. al, 2007)	0,2g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	5g NaCl
	40g Saccharose
	10g Glycerin

in 1 l ddH₂O lösen und autoklavieren. Für einen MYRO-Agar wurden 16 g/l Agar hinzugefügt.

Sowohl der 8/1_DsRed Stamm als auch die generierten Mutanten wurden in flüssigem CM für 3 Tage bei 28 °C bei 145 rpm im Dunkeln kultiviert. Hierfür wurde in einem Rundhalskolben 20 ml des Mediums mit 5.000 Konidien des jeweiligen Stammes inokuliert. Die Myzelernte erfolgte mit Hilfe von Myracloth (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und eines Trichters. Nach 2-maligem Waschen mit sterilem ddH₂O wurde das Myzel getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Neben der Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte ebenfalls eine Kultivierung auf Festmedium, z.B. während der Anzucht neuer Transformanten. Je nach vorhandener Antibiotikaresistenz des Pilzes wurde die entsprechende Menge Antibiotikum dem Komplettmedium hinzugefügt um eine Endkonzentration von 100 µg/ml zu erhalten. Die Inkubation auf Festmedium erfolgte ebenfalls für 3 Tage bei 28 °C.

Die Konidienproduktion wurde mit SNA-Festmedium induziert. Hierfür wurde ein Myzelblock von einer bewachsenen CM-Platte ausgestanzt und auf eben genanntes Medium überführt. Die SNA-Platten wurden abgedichtet und für 7-10 Tage bei 20 °C und einer Lichtperiode von 16 Stunden inkubiert. Die Konidienenernte erfolgte durch das Abwaschen der Konidien mittels 3 ml sterilem ddH₂O und leichtem Schwenken der Platte. Anschließend wurde die Konidienanzahl mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt.

Für die Induktion der DON- und Butenolid-Biosynthese wurde ein modifiziertes „MYRO“ Medium verwendet. Die Kultivierung und Myzelernte erfolgte zunächst in Komplettmedium wie zuvor beschrieben. Anschließend wurde 1 g Myzel in 50 ml MYRO überführt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Als Induktionsmittel wurde 500 µl Di-Ammoniumhydrogenphosphat (0,5 M (NH₄)₂HPO₄) verwendet (Harris et al., 2006). Die nicht-induzierten Kontrollen wurden mit 500 µl Kalziumnitrat (0,5 M Ca(NO₃)₂) versetzt. Für den Wachstumsversuch mit Butenolid wurde für alle untersuchten phytopathogenen Pilze ein Minimalmedium verwendet. Die Inkubation erfolgt für 24 bzw. 48 Std. bei 28 °C und 145 rpm im Dunkeln.

Bakterien und Hefen

YPG-Medium 10 g Hefe-Extrakt
 20 g Peptone
 20 g Glukose

Mit ddH₂O auf 1 l auffüllen.

R2A Medium 0,5 g Pepton
 0,5 g säurehydrolysierte Casaminoaciden
 0,5 g Hefeextrakt
 0,5 g Glukose
 0,5 g lösliche Stärke
 0,3 g K₂HPO₄
 0,3 g Natrium-Pyruvat
 0,05 g MgSO₄ × 7 H₂O

Mit ddH₂O auf 1 l auffüllen.

Lysogeny broth (LB) 10 g/l Trypton
Medium 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl₂

Mit ddH₂O auf 1 l auffüllen. Für eine Selektion mit Ampicillin wurde das Medium mit einer Konzentration von 200 µg/ml Ampicillin hergestellt.

Für YPG-, R2A- oder LB- Agar wurden 16 g/l Agar verwendet.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Kultivierungsbedingungen aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme aufgelistet.

Tab. 7: Kultivierungsbedingungen verwendeter Bakterien- und Hefestämme

Name	Medium	Temperatur
<i>Escherichia coli</i>	LB	37 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	LB	37 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	YPG	28 °C
<i>Micrococcus aureus</i>	YPG	28 °C
<i>Rhizobium sp. NG234</i>	R2A	28 °C
<i>Janthino HH102</i>	R2A	28 °C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YPG	28 °C

2.2.3 Isolierung von genomischer DNA mit CTAB

Die Isolation von gDNA wurde entweder aus *F. graminearum* Myzel oder aus infiziertem Pflanzenmaterial mit der CTAB-Methode zur Isolierung von gDNA wie folgt isoliert:

CTAB Lysispuffer 14,45 ml ddH₂O
 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0)
 7,0 ml 5 M NaCl
 1,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 0,5 g CTAB

TE-Puffer, 1L 10,0 ml 1 M Tris (pH 7,0)
 2,0 ml 0,5 M Na₂EDTA

Auf 1 l mit ddH₂O auffüllen.

Geerntetes Myzel bzw. infiziertes Weizenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver verarbeitet. 10-30 mg des Pulvers wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml CTAB-Lysispuffer versetzt und für 1h bei 65 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur (10 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Chloroform versetzt. Nach zehnmalem Invertieren wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und die obere, wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Es folgte die Zugabe von 750 µl Isopropanol. Nach wiederholtem Invertieren wurde der Ansatz 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch die Zugabe von 500 µl 70% Ethanol und einer Zentrifugation von 10 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde wieder entfernt und das Pellet auf einem Heizblock bei 37 °C für 10 min getrocknet. Anschließend wurden 100 µl mit 1 µl RNase A versetzter TE-Puffer hinzugegeben und die DNA für 30 min bei 55 °C inkubiert.

2.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Nukleinsäure-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer	242 g	Tris
	100 ml	0,5 M Na ₂ EDTA, pH 8,0
	54,1 ml	Eisessigsäure
Mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen.		

6x Ladepuffer	250 mg	Bromphenolblau
(Eigenherstellung)	250 mg	Xylene cyanol FF
	33 ml	150 mM Tris, pH 7,6
	60 ml	Glycerol
	7 ml	ddH ₂ O

Für die Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mussten zunächst diverse Fragmente mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert werden. Sowohl die Reaktionsansätze, als auch die Denaturierungs- und Elongationstemperaturen wurden nach Herstellerangaben angewandt. Die Annealingtemperatur für die in dieser Arbeit verwendeten Primer lag zwischen 58 und 60 °C. Die erste Überprüfung der erfolgreichen Deletion eines Gens wurde ebenfalls mittels PCR durchgeführt. Hierfür wurden geninternen Primer verwendet, welche nur auf dem ORF des auszuschaltenden Gens banden. Bei einer erfolgreichen Deletion kann somit kein DNA-Fragment amplifiziert werden. Entsteht ein Fragment mit richtiger Größe kann dies als Nachweis für das Vorhandensein des Gens gewertet werden.

Für die Überprüfung von Transkripten wurde in cDNA synthetisierte mRNA verwendet (2.2.8.2). Die Überprüfung der amplifizierten Fragmente erfolgte über ein 0,8% bzw. 1,6% (RT-PCR-Produkte) Agarosegel in 1x TAE Puffer. Es wurden 5-10 µl aufzutrennendes Produkt im Verhältnis 5:1 mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gele liefen bei 75-120 Volt für 60-120 Minuten. Es folgte die Färbung der RNA/DNA innerhalb des Gels in einem Ethidiumbromidbad für 10-20 Minuten. Die Geldokumentation erfolgte in einem UV-Transilluminator (SynGene Genius, Bio Imaging System).

2.2.5 Klonierungsstrategien zur Erstellung von Plasmiden

2.2.5.1 Hefe-Rekombinationsklonierung

Transformation von *S. cerevisiae*

1 M Lithiumacetat

50% PEG 3350 (w/v)

Lachssperma-DNA (10 mg/ml)

SD -Uracil Agar: 8 g D-Glukose
 6,7 g Difco® yeast nitrogen base ohne Aminosäuren
 0,77 g Clontech –Ura Dropout (DO) supplement
 16 g Difco-Agar

Die Charakterisierung von Genen findet meist zunächst über eine Gendeletion statt. Die Plasmide, die für einen solchen „knock-out“ benötigt werden, werden mit dem Hefe-Rekombinationssystem (Colot et al., 2006) kloniert. Dieses macht sich die Eigenschaft zunutze, dass mehrere DNA-Fragmente mit homologen Abschnitten in einigen Organismen zu einem Fragment zusammengebaut werden können (= homologe Rekombination, s. Abb. 4).

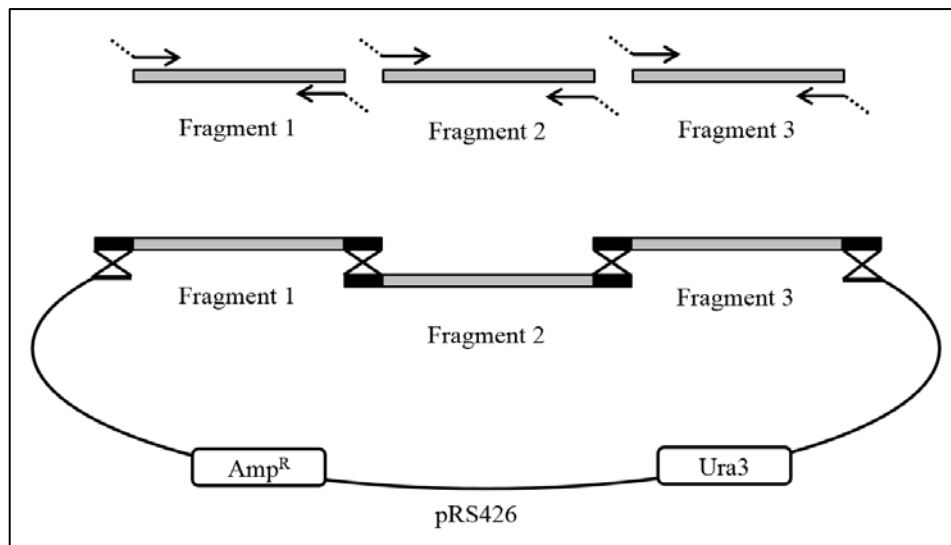


Abb. 4: Schematische Darstellung der Hefe-Rekombinationsklonierung. Der linearisierte pRS426 (Christianson et al., 1992) Vektor wird zusammen mit den zu verknüpfenden PCR-Fragmenten in den *S. cerevisiae* Stamm FV834 transformiert. Die verwendeten Primer (schwarze Pfeile) weisen ca. 30 bp lange Überhänge auf (gestrichelte Linie), die homolog zum jeweils benachbarten Fragment sind. Diese Überhänge werden durch den Mechanismus der homologen Rekombination zu einem funktionalen Plasmid zusammengefügt. Amp^R: Resistenzkassette für Ampicillin; URA3: Gen zur Uracil-Synthese.

Für die Klonierung eines Deletionsplasmids wurden Fragmente benötigt, die zuseiten des zu deletierenden Gens liegen. Dies sind die so genannten „Flanken“ oder flankierenden Regionen. Sie wurden mittels PCR aus dem Genom von *F. graminearum* amplifiziert (2.2.4). Die verwendeten Primer (vgl. Tab. 2) besaßen ca. 30 bp lange Überhänge, wodurch homologe Bereiche zu angrenzenden Fragmenten entstanden. Die so entstandenen Flanken

besaßen sowohl einen Überhang zu dem Vektor pRS426, als auch zu einer Resistenzkassette, mit der im späteren Verlauf transformierte Pilzkolonien selektiert werden konnten. Das in dieser Arbeit klonierte Deletionsplasmide pΔBut, welches das Gen FGSG_08079 ausschalten sollte, besitzt das Nourseothricin-Resistenzgen (= NAT). Dieses wurde mittels Restriktion (2.2.5.2) aus dem pNRI Vektor (2.1.5) unter Verwendung der Enzyme *EcoRI* und *SacII* isoliert. Die generierten Flanken besaßen eine Größe von 993 bp („Linke Flanke“) und 1072 bp („Rechte Flanke“) (Primer s. Tab. 2). Da benachbarte Gene von FGSG_08079 zu nah an dessen kodierender Sequenz lagen, reichten die Flanken in den ORF (engl., open reading frame, offenes Leseraster) von FGSG_08079 hinein.

Das zweite in dieser Arbeit erstellte Deletionsplasmid war pΔFgCPP1. Hiermit sollte das Gen FGSG_10212 deletiert werden. Dieses Plasmid enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette, welche via PCR aus dem Vektor pGEM-T/Hyg amplifiziert wurde. Die linke flankierende Region besaß eine Größe von 477 bp, die rechte Flanke 498 bp (Primer s. Tab. 2). Das dritte verwendete Deletionsplasmid für die Deletion von FGSG_11205 (pΔFgCPP2) wurde im Zuge einer Bachelorarbeit von Tobias Quase erstellt.

Neben dem Deletionsplasmid wurde das Komplementationsplasmid pKΔBut nach dem gleichen Prinzip erstellt. Hierfür wurde der komplette ORF des Gens FGSG_08079 und zusätzlich 643 bp des 5' UTRs (engl. untranslated region; untranslatierte Region) via PCR amplifiziert (2.2.4) um den nativen Promotor des Zielgens ebenfalls zu erhalten. Dieses erste Fragment besaß einen Überhang zu dem Vektor pRS426 und zur Hygromycin-Resistenzkassette (= Hyg^R). Letzteres wurde aus dem pGEM-T-Hyg Vektor amplifiziert. Bei dem dritten Fragment, welches einen Überhang sowohl zum 3'-Ende des Hyg^R-Gens als auch zum pRS426 Vektor hatte, handelte es sich um das 3'UTR der FGSG_08079 Sequenz (= Rechte Flanke). Der linearisierte und dephosphorierte pRS426 Vektor wurde zusammen mit den generierten Fragmenten für die Transformation von *S. cerevisiae* verwendet (2.2.5.1). Dieser Vektor besitzt neben einer Ampicillin-Resistenz das URA3-Gen, welches für die Uracil-Biosynthese zuständig ist. Bei einer erfolgreichen Transformation Uracil-auxotropher Zellen mit dem pRS426 Vektor sind diese in der Lage, auf Selektionsmedien ohne Uracil zu wachsen. Alle Fragmente wurden nach der PCR über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und auf ihre Größe hin überprüft (2.2.4). Fragmente richtiger Größe wurden aus dem Gel geschnitten, mit dem „Nucleospin Extract II PCR Clean-up Gel-Extraction Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend ihre Konzentration mit dem Nano Vue Plus Spektrophotometer (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) bestimmt.

Die Hefetransformation wurde wie folgt durchgeführt:

Als erstes musste eine über-Nacht-Kultur (ü.N.) hergestellt werden. Hierfür wurden 50 ml YPD Medium mit einer Kolonie des Stammes *S. cerevisiae* FY 834 beimpft und bei 28 °C schüttelnd kultiviert. Dieser Hefe-Stamm ist auxotroph für die Uracil-Biosynthese. Dies dient der späteren Selektion von erfolgreich transformierten Hefezellen. Am Folgetag wurden nochmals 50 ml desselben Mediums mit 5 ml der ü.N.-Kultur beimpft und für 4 Std. unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Danach wurden die Zellen bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 10 ml sterilem ddH₂O aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Es folgte die Aufnahme des Pellets in 1 ml 100 mM Lithium-Acetat, erneute Zentrifugation und abschließende Aufnahme des Zellpellets in 400 µl 100 mM Lithium-Acetat. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Als nächstes wurde für 5 min Lachssperma-DNA aufgekocht und anschließend für ebenfalls 5 min auf

Eis abgekühlt. Währenddessen wurden die unterschiedlichen Transformationsansätze vorbereitet. Neben dem eigentlichen Transformationsansatz mit allen Fragmenten wurden drei verschiedene Kontroll-Transformationen durchgeführt:

- Positivkontrolle: Transformation mit zirkulärem Vektor, ohne Fragmente
- Religationskontrolle: Transformation mit linearisiertem Vektor, ohne Fragmente
- Negativkontrolle: Transformation ohne Vektor und Fragmente

Als Vektor wurde der bereits genannte pRS426 verwendet. Die Linearisierung fand mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* in zwei aufeinander folgenden Restriktionsansätzen (2.2.5.2) statt. Die Transformationsansätze setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

240 µl	50% PEG 3350
36 µl	1 M Lithium-Acetat
x µl	Linearisierter/zirkulärer Vektor (~ 100 ng)
x µl	PCR-Fragmente/Resistenzkassette (~ 400-600 ng)

auf 360 µl mit sterilem ddH₂O auffüllen

Je nach Kontrollansatz wurde entweder der linearisierte oder der zirkuläre Vektor verwendet. Zu den Ansätzen wurden abschließend 10 µl der Lachssperma-DNA und 50 µl der Hefezellen gegeben und zuerst 30 min bei 30 °C und dann 15 min bei 45 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 2000 rpm für 2 min pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 200 µl sterilem ddH₂O aufgenommen. Es wurden 1:10 Verdünnungen der Zellsuspensionen hergestellt (20 µl Suspension + 180 µl ddH₂O) und sowohl die Verdünnung als auch die unverdünnte Suspension auf je einer SD -Uracil-Platte ausplattiert. Es folgte die Inkubation der Platten bei 30°C für 3-4 Tage.

Plasmid-Isolation aus *S. cerevisiae*

Hefe-Lysispuffer	Triton x-100 4 ml
	10% SDS 20 ml
	5 M NaCl 4 ml
	0,5 M EDTA 400 µl
	1 M Tris 2 ml
	Auf 200 ml mit ddH ₂ O auffüllen

3 M Natrium-Acetat

4 M Ammonium-Acetat

Säure-behandelte Glass-beads (435-600 µm) Glass-beads für 24 Std. in 37%iger HCl inkubieren, mit ddH₂O waschen, trocknen

Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25:24:1)

Für die Plasmid-Isolation wurde 20 ml SD -Uracil Flüssigmedium mit einer Hefekolonie von den Transformationsplatten inokuliert und für 2 Tage bei 28°C angezogen. Danach wurden die Zellen für 5 min und 1500 rpm zentrifugiert, in 500 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer kurzen Zentrifugation

von 5 sek wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Phenol : Chlorophorm : Isoamylalkohol und 0,3 g Glass-beads. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min in einer Schwingmühle auf höchster Stufe. Nach der Zugabe von 200 µl TE-Puffer wurden die Ansätze invertiert und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmal mit 200 µl Chlorophorm versetzt, invertiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 1 ml 96% Ethanol versetzt und 15 min bei -20 °C inkubiert.

Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C. Das Pellet wurde in 400 µl RNaseA-versetztem ddH₂O resuspendiert und für ca. 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl 4 M Ammonium-Acetat und 1 ml 96% Ethanol wurden die Ansätze für 20 min und 13.000 rpm zentrifugiert und das dadurch entstandene Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 30 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und für 30 min bei 55°C inkubiert.

2.2.5.2 Klassische Klonierung

Neben der Erstellung von Plasmiden mittels Hefe-Rekombinationssystem findet die klassische Klonierungsmethode über Restriktionsschnittstellen ebenfalls ihre Anwendung in dieser Arbeit. Hier wird ein Fragment mit Hilfe der PCR amplifiziert (2.2.4), wobei die eingesetzten Primer spezifische Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende aufweisen (s. Tab 2, 2.1.3). Für das auf diese Weise klonierte Plasmid pOE_But wurde die Schnittstelle des Enzyms *Bam*HI an die Primer gesetzt. Sie dienen der Ligation des Fragmentes in einen Vektor, der mit demselben Restriktionsenzym behandelt wurde. Um eine größere Menge des Fragmentes zu erhalten und, um die Enden der Schnittstellen für eine gerichtete Ligation freizulegen, wurde dieses in den pJet1.2/blunt Vektor (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zwischenkloniert und in *E.coli* transformiert (2.2.5.3). Nach der Isolierung des Plasmids (2.2.5.3) wurde das Fragment via Restriktion isoliert, in den mit *Bam*HI linearisierten Überexpressionsvektor pAN7.1/GluA ligiert und in *E.coli* transformiert. Nachfolgend ist das Pipettierschema eines Restriktions- und Ligationsansatzes aufgeführt.

Pipettierschema eines 50 µl Restriktionsansatzes

5 µl	10x Puffer
2 µl	Enzym(e)
x µl	Plasmid oder gDNA (1-20 µg)

Auf 50 µl mit sterilem ddH₂O auffüllen.

Pipettierschema eines 20 µl Ligationsansatzes

10 µl	2x Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (3 U/µl, New England BioLabs)
1 µl	linearisierter Vektor (ca. 50 ng)
x µl	DNA-Fragment (ca. 200 ng)

Auf 20 µl mit sterilem ddH₂O auffüllen.

2.2.5.3 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen

Erstellte Plasmide wurden in kompetente, Kanamycin-resistente *E. coli* Zellen des Stammes One Shot® OmniMAX™ (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) transformiert. Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert.

SOC-Medium, pH 7,0: 2% Bacto Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 0,01 M MgCl₂
 20 mM Glukose

Die *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit entweder 15 µl Hefe-Plasmid oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 35 sek mit anschließender Inkubation auf Eis für 3 min. Für die Regeneration der Zellen wurden 500 µl SOC-Medium auf die Zellen gegeben und der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Regenerationszeit wurden je 100 µl bzw. 400 µl der Zellsuspension auf LB_{amp}-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 3 ml LB_{amp}-Flüssigmedium mit jeweils einer Kolonie beimpft und ebenfalls ü.N. bei 37 °C kultiviert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte am Folgetag mit dem „Nucleic Acid and Protein Purification NucleoBond Xtra Mini Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die Überprüfung der Plasmide wurde via Restriktionsanalyse mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt (Tab. 8, 2.2.5.2).

2.2.6 Protoplasten-Transformation von *F. graminearum*

YEPD-Medium	0,3% Hefe-Extrakt 1% Bacto-Pepton 2% Glukose in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Enzymmix (10 ml je Transformation)	2,5% Driselase® von <i>Basidiomycetes sp.</i> (Sigma-Aldrich) 0,5% Lytische Enzyme von <i>Trichoderma harzianus</i> (Sigma-Aldrich) in 1,2 M Kaliumchlorid lösen, steril filtrieren
STC-CO-Puffer	20% Saccharose 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 50 mM CaCl ₂ in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
PEG-CO-Puffer	40% PEG 4000 (autoklaviert) 60% STC-CO-Puffer

TB3-Puffer 20% Saccharose
 0,3% Hefe-Extrakt
 0,3% Säure-hydrolysiertes Casein
 in ddH₂O lösen und autoklavieren

TB3-Agar TB3-Puffer mit 1,5% Agar versetzt, autoklavieren

Zur Vorbereitung für die Pilz-Transformation wurden 30 µg Plasmid-DNA verdaut (2.2.5.2). Im Falle der Deletion von FGSG_08079 wurde das Deletionskonstrukt, bestehend aus den Flanken und der Resistenzkassette, mit den Enzymen *XhoI* und *SacI* aus dem pΔBut Plasmid isoliert. Damit wird die homologe Rekombination im nativen Genlokus (= *in locus*) durch ein Doppeltes-Crossingover ermöglicht. Das Überexpressionsplasmid pOE_But wurde mit *EcoRV* linearisiert. Dadurch wurde das Plasmid innerhalb des ORF linearisiert, sodass eine Integration via single-crossover ermöglicht werden konnte. So gelangte das Konstrukt *in locus*. Das Komplementationsplasmid pKΔBut wurde mit *AhdI* im Rückgrat des Plasmids linearisiert. Die Integration in das Genom erfolgte unspezifisch (ektopisch).

Der erste Schritt der Transformation von *F. graminearum* ist die Generierung von Protoplasten. Hierfür wurden 50 ml YEPD-Medium mit 1×10^6 Konidien inokuliert und über Nacht bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Das Myzel der ausgekeimten Konidien wurde mit Hilfe eines 40 µm Siebes vom Medium getrennt und mit 200 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Myzel auf einen Stapel sterilen Whatman-Papiers transferiert und getrocknet. Der zellwandabbauende Enzymmix wurde angesetzt und für 30 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung bei 4100 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Für die Protoplastierung wurden 0,5 g des Myzels mit der Enzymlösung in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben für 2,5 Stunden bei 30 °C und 80 rpm inkubiert. Die Protoplasten wurden dann als erstes durch ein 100 µm Sieb, anschließend durch ein 40 µm Sieb gefiltert um mögliche Myzelreste von den Protoplasten zu trennen. Zwischendurch wurden die Protoplasten mit 10 ml einer 1,2 M Kaliumchlorid-Lösung gewaschen und im Anschluss bei 2000 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml STC-CO-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (2000 rpm, 10 min) und die Protoplasten in einer Konzentration von 1×10^8 /ml in STC-CO-Puffer aufgenommen. Für eine Transformation wurden 200 µl (2×10^7 Protoplasten) benötigt und mit dem geschnittenen Plasmid (3- 10 µg) versetzt. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG-CO-Puffer zum Ansatz pipettiert, dieser gründlich gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 5 ml TB3-Puffer wurden zur Regeneration der Protoplasten zu dem Ansatz hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Schließlich wurden 50 ml 1,5% Agar in TB3-Puffer (abgekühlt auf etwa 50 °C) zu der Lösung gegeben und diese auf fünf Petrischalen (ø 96 mm) verteilt. Zur vollständigen Regeneration der transformierten Protoplasten wurden die Platten über Nacht bei 28 °C gelagert und am nächsten Tag mit jeweils 10 ml einer 1,5%igen Wasseragar-Lösung, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hygromycin B 100 µg/ml; Nourseothricin 100 µg/ml), überschichtet. Die Platten wurden für weitere zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert. Erfolgreich transformierte Protoplasten wuchsen als Primärtransformanten durch den Selektionsagar. Kleine Myzelblöcke wurden von den Transformanten isoliert und auf neue Platten mit Selektionsagar transferiert.

Die beschriebene *F. graminearum*-Transformation wurde immer von den technischen Assistentinnen Birgit Haderl und Cathrin Kröger (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek) durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Namen der in dieser Arbeit erstellten Mutanten, deren Beschreibung und die Namen der transformierten Plasmide aufgelistet:

Tab. 8: In dieser Arbeit erstellte Mutanten und für die Transformation verwendete Plasmide

Name	Plasmid	Verwendete Enzyme	Beschreibung	Transformationsnummer
ΔBut-1-3	pΔBut	<i>XhoI</i> , <i>SacI</i>	Deletion des Gens FGSG_08079	1 = 1776.1.1 2 = 1776.4.3 3 = 1585.6.5
OE_But-1-3	pOE_08079	<i>EcoRV</i>	Überexpression des Gens FGSG_08079	1 = 1758.13.2 2 = 1758.14.2 3 = 1758.17.1
KΔBut-1-3	pKΔBut	<i>AhdI</i>	Komplementation einer ΔBut Mutante	1 = 1835.1.2 2 = 1835.5.2 3 = 1835.20.1
ΔFgCPP1	pΔFgCPP1	<i>XhoI</i> , <i>SmaI</i>	Deletion des Gens FGSG_10212 (FgCPP1)	1 = 1534.24.3
ΔFgCPP _{1,2}	pΔFgCPP2	<i>XhoI</i> , <i>SacI</i>	Deletion des Gens FGSG_11205 (FgCPP2)	1 = 1576.1.1

2.2.7 Vereinzelung von Konidien

Durch die Vereinzelung von Konidien der Primärtransformanten wurden Klone erhalten, die aus einer einzigen Konidie hervorgegangen sind. Sie sind somit homokaryotisch, da die in der Konidie enthaltenden Kerne mitotisch aus einem Ursprungskern entstehen (Deacon, 1997). Nach dem Umsetzen der Primärtransformanten und Bewachsen der neuen Selektionsplatten konnten Konidien vom Zentrum der Platte mit sterilem ddH₂O abgeschwemmt und auf eine Wasseragarplatte (1,6%) ausplattiert werden. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht konnten ausgekeimte Konidien unter Verwendung einer Stereolupe entdeckt, aus dem Agar entfernt und auf neue Selektionsplatten überführt werden. Die so erhaltenen Transformanten werden als Sekundärtransformanten bezeichnet.

2.2.8 Methoden zum Nachweis einer Gendeletion und -überexpressionen

2.2.8.1 Phenol-Chloroform Extraktion von gesamt-RNA

Um herauszufinden, ob das Gen FGSG_08079 tatsächlich in den generierten Überexpressions-Mutanten stärker exprimiert wurde, wurde RNA isoliert und die darin enthaltene mRNA (messenger RNA) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben.

Die gesamt-RNA Extraktion erfolgte mit dem peqGOLD TriFast Reagenz der Firma peqlab nach Anleitung. Das hierfür eingesetzte Myzel (ca. 10-20 mg) wurde in flüssigem CM kultiviert, vom Medium getrennt und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Die isolierte gesamt-RNA wurde über ein 0,8% Agarosegel überprüft (2.2.4) und deren Konzentration mit einem Nano Vue Plus Spektrophotometer (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) bestimmt.

2.2.8.2 cDNA Synthese und Überprüfung via PCR

Vor der Synthese von mRNA in cDNA mussten mögliche gDNA Rückstände entfernt werden. Hierfür wurde die isolierte RNA mit DNase nach Angaben des „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fermentas) behandelt. Die cDNA Synthese erfolgte mit ebenjenem. Um ausschließen zu können, dass entstehende PCR-Produkte ihren Ursprung in gDNA (als Restkontamination im Ansatz) haben könnten, wurden Kontroll-PCR-Reaktionen mit Primern durchgeführt, die einen Genabschnitt mit Intron amplifizierten (2.2.4). Hierdurch war nach erfolgter gelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente (2.2.4) eine eindeutige Unterscheidung zwischen PCR-Produkten möglich, die der cDNA entstammten (ohne Intron, kleiner), und denen, die gDNA zum Ursprung hatten (mit Intron, größer). Durch die Verwendung der Primer „JBGScreenfw“ und „JBGScreenrev“ konnte ein etwa 495 bp (cDNA) bzw. 772 bp (genomische DNA) großes Fragment amplifiziert werden

2.2.8.3 Quantitative RealTime PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR ermöglicht gleichzeitig die Amplifikation von Nukleinsäuren und ihre Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessungen. Dazu wurde der „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“ (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Bei SYBR-Green handelt es sich um einen Cyan-Fluoreszenzfarbstoff, der nur in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. Dieser DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 522 nm. Da der SYBR-Green-Farbstoff auch unspezifisch an dsDNA bindet, kann nicht zwischen unterschiedlichen PCR-Produkten unterschieden werden. Durch die Bestimmung der Schmelztemperatur wird dieses Problem gelöst: Die Temperatur wird kontinuierlich von 50 °C bis 95 °C erhöht. Dabei denaturiert jedes Amplifikat bei einer spezifischen Schmelztemperatur, was mit einer Freisetzung von SYBR-Green und somit einer Fluoreszenzabnahme einhergeht. Auf diese Weise kann die Spezifität des PCR-Produktes abgeschätzt werden.

Neben der Überprüfung der Überexpressionsmutanten auf erhöhte Expression des Gens FGSG_08079 im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed *in vitro* wurden Expressionsanalysen des kompletten Butenolid-Clusters in allen generierten Mutanten mittels qRT-PCR durchgeführt. Für die relative Quantifizierung des Transkriptionsniveaus eines Gens wurde das „house-keeping gene“ β -Tubulin als Referenzgen verwendet (Tab. 3). Es ist ein in jeder Zelle konstant exprimiertes Gen und bietet dadurch die Möglichkeit zur Normierung der Expressionsanalysen. Es wurden drei technische Replikate pro untersuchter cDNA durchgeführt. Als Kontrolle für Kontaminationen diente ein Ansatz mit 3 Replikaten, in dem steriles ddH₂O als Template eingesetzt wurde.

Die Validierung der Transkriptomdaten aus Infektionskissen (engl. infection cushions, IC), Laufhyphen (engl. runner hyphae, RH) und einer axenischen Kultur (engl. mycelia, MY) wurde mit eben jener cDNA durchgeführt, die auch für die RNA-Sequenzierung zur Generierung dieser Daten verwendet wurde. Zusätzlich dazu wurde jeweils ein weiteres, drittes biologisches Replikat analysiert. Die cDNAs wurden von Michael Mentges (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Folgende Gene wurden für die Validierung mittels qRT-PCR untersucht: FgTRI5 (FGSG_03537), FgPKS12 (Polyketidsynthase 12; FGSG_02324), FgEF1 (FGSG_04213; Effektor 1) und zwei GABA-Transaminasen (FgGTA1, FGSG_05554; FgGTA2, FGSG_06751). Die dazugehörigen Primersequenzen sind der Tabelle 1 (2.1.3) zu entnehmen. Als Referenzgene zur Normierung der Expressionen wurden für die Validierung sowohl Ubiquitin (FGSG_10805) als auch Cofilin (FGSG_06245) verwendet. Für die Evaluierung geeigneter Referenzgene wurde das Online-Tool „RefFinder“ verwendet. Dieses umfasst folgende vier Programme: DeltaCT (Silver et al. 2006), BestKeeper (Pfaffl et al. 2004), normFinder (Andersen et al. 2004) und Genorm (Vandesompele et al. 2002). Die Analyse von 162 Ct-Werten, erhalten aus allen für die Validierung durchgeführten qRT-PCRs, empfahl Ubiquitin und Cofilin als die geeignetsten Referenzgene. Der Reaktionsansatz eines Replikates für alle durchgeführten qRT-PCRs setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

5 µl SYBR Green 2 x Master-Mix
 0,2 µl Primer fw (10 µM)
 0,2 µl Primer rv (10 µM)
 3,6 µl ddH₂O
 1 µl cDNA (1:5) oder 1 µl gDNA (100 ng/µl)

Die Reaktion wurde im Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit folgendem Temperaturprofil vollzogen:

94 °C	Erste Denaturierung	5 min	} 40×
94 °C	Denaturierung	30 sek	
58 °C	Primer-Annealing	30 sek	
72 °C	Elongation	x min	
72 °C	Letzte Elongation	0 min	
4 °C	Lagerung		

Die Auswertung erfolgte anhand der ausgegebenen Ct-Werte (cycle threshold, auch CP, crossing point) mit dem Programm REST-348 (Relative Expression Software Tool; Pfaffl et al. 2002). Der Ct-Wert beschreibt den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Am Ct befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Eine signifikante Veränderung wurde nach dem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl et al. 2002) berechnet.

2.2.8.4 Southern Blot

Mit Hilfe der Southern-Blot Methode können spezielle DNA-Sequenzen durch DNA-DNA Interaktion nachgewiesen werden. Das Fehlen oder die zusätzliche Integration eines Gens nachzuweisen ist so ebenfalls möglich.

Depurationspuffer	0,25 M HCl
Denaturationspuffer	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisationspuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl 20 × SSC 175,2 g NaCl 88,2 g Na-Citrat, auffüllen auf 1000 ml ddH ₂ O
5 x B1 Puffer, pH 7,5	58,05 g Maleinsäure 43,83 g NaCl, auffüllen auf 1000 ml ddH ₂ O
10% Blocking-Lösung (Roche) in 1 x B1 Puffer	
Prähybridisierungspuffer	5× SSC 0,1% N-Lauryl-Sarkosine 0,2% SDS 2% Blocking-Lösung
Hybridisierungspuffer	Prähybridisierungspuffer + Dig-Sonde
W1-Puffer	2 x SSC 0,1% SDS
W2-Puffer	0,2 x SSC 0,1% SDS
B2-Puffer	1 x B1-Puffer 1% Blockingreagenz
Antikörper-Lösung	Anti-Digoxegenin-AP Fab fragments (Roche), 1:10.000 in B2
WP-Puffer	1 x B1 0,3% Tween 20
B3-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 9,5 100 mM NaCl
CSPD-Lösung	Chemilumineszens Reagenz CSPD (Roche), 1 : 100 in B3

Die genomische DNA wurde zunächst mit ausgewählten Restriktionsenzymen behandelt (2.2.5.2). Welche Enzyme hierbei verwendet werden hängt von der zu analysierenden Sequenz ab. Nach der Restriktion der gDNA wurde diese mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 1 Volumen Isopropanol gefällt, in 40 µl sterilem ddH₂O aufgenommen, in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt (2.2.4) und anschließend in einem Ethidiumbromidbad angefärbt, um die Restriktion zu überprüfen. Es folgte eine Behandlung des Gels für je 10 min mit einem Depurations-, Denaturierungs- und Neutralisationspuffer. Anschließend erfolgte der Aufbau des Blottes. In eine Schale wurden 500 ml 20 × SSC gefüllt.

Eine Glasplatte diente als Brücke für die Filterpapierbrücke, damit diese nur an den Enden mit dem Puffer in Berührung kam. Sie wurde vorher mit $20 \times \text{SSC}$ getränkt. Auf die Filterpapierbrücke wurde das behandelte Agarosegel gelegt. Es folgten die Nylonmembran und 4 Lagen Filterpapier. Beides wurde vorher in $2 \times \text{SSC}$ getränkt. Auf die Filterpapiere wurde ein ca. 12 cm breiter Stapel trockene Papiertücher gelegt und mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in $2 \times \text{SSC}$ geschwenkt und die DNA mit einem UV-Transilluminator (Stratalinker) auf der Membran fixiert. Es folgte eine 2-minütige Inkubation der Membran in $2 \times \text{SSC}$ mit anschließender Inkubation in 20 ml Prähybridisierungspuffer für 5 Std. und mit dem Hybridisierungspuffer über Nacht bei 68°C . Letzterer enthielt eine DNA-Sonde, mit der die Präsenz, die Häufigkeit oder das Fehlen einer spezifischen DNA-Sequenz nachgewiesen werden kann. Die DNA-Sonde ist ein Sequenzabschnitt der zu analysierenden DNA-Sequenz und wurde via PCR mit digmarkierten Desoxynukleotiden erstellt (Roche, Basel, Schweiz). Im Verlauf der Amplifikation des Sequenzabschnittes werden stellenweise dUTP (Deoxyuridin-Triphosphat) anstelle von dTTP (Desoxythymidin-Triphosphat) eingebaut. An dem dUTP hängt das Glycosid Digoxigenin, welches für die Detektion der Sonde im weiteren Verlauf entscheidend ist. Nach der Hybridisierung folgten einige Wasch- und Inkubationsschritte der Membran, die im Folgenden aufgelistet sind.

- 2×5 min mit 50 ml W1-Puffer, RT
- 2×15 min mit 50 ml W2-Puffer, 68°C
- 1 x schwenken in WP-Puffer
- 60 min mit B2-Puffer, RT
- max. 30 min mit 15 ml Antikörper-Lösung, RT
- 3×20 min WP-Puffer, RT
- 5 min mit 15 ml B3-Puffer

Anschließend wurde die Detektion durchgeführt. Hierfür wurden 500 μl einer CSPD-Lösung auf eine Seite einer aufgeklappten, doppelseitigen Folie gegeben, die Membran mit der DNA-Seite auf die Lösung gelegt und entstandene Luftblasen entfernt. Nach einer Inkubation von 5 min im Dunkeln bei RT wurde die Folie ausgewechselt, die Membran in eine Entwicklerkassette gelegt und dann für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Detektion durchgeführt. Durch die Bindung des anti-DIG-Antikörpers an die eingebauten dig-dUTP's der DNA-Sonde kann das gebundene Enzym durch die Zugabe des Substrates CSPD eine Lichtreaktion. Diese so genannte Chemolumineszenz wurde mit einem LAS-3000 (Fujifilm-Europe, Düsseldorf, Deutschland) detektiert.

2.2.9 Charakterisierung von Deletions- und Überexpressionsmutanten

2.2.9.1 Quantifizierung von pilzlicher DNA in infiziertem Pflanzenmaterial

Um Unterschiede in der Wachstumsrate während des Infektionsprozesses zwischen generierten Mutanten im Vergleich zum 8/1_DsRed zu analysieren, wurde die Menge an Pilz in infizierten Weizenähren unter Verwendung der qRT-PCR (2.2.8.3) bestimmt.

Hierfür wurden, wie im nachfolgenden Kapitel ausführlich beschrieben, Weizenähren mit Konidien inokuliert. Nach 5 Tagen wurden die Ähren geerntet und die inokulierten Blüten inkl. nach oben und nach unten angrenzender Bereiche isoliert, unter Verwendung von flüssigem Stickstoff gemörst und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Es folgte die Isolierung von gDNA (2.2.3) mit anschließender qRT-PCR (2.2.8.3) mit Pilz-spezifischen β -Tubulin Primern für die Quantifizierung von Pilz gDNA (Voigt et al. 2007). Anhand einer eigens erstellten Standardkurve mit reiner Pilz gDNA konnte so die jeweils isolierte Menge an gDNA bestimmt und das Verhältnis von Mutanten DNA zu 8/1_DsRed-DNA berechnet werden. Für die Standardkurve wurde gDNA seriell verdünnt (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 ng/ μ l). 1 μ l der verdünnten gDNA wurde für eine qRT-Analyse eingesetzt. Die erhaltenen gDNA Konzentrationen wurden gegen die Ct-Werte logarithmisch dargestellt.

Mit der daraus resultierenden Geradengleichung können gDNA Konzentrationen anhand ermittelter Ct-Werte aus einer qRT-PCR berechnet werden. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm) durchgeführt.

Für die Bestimmung von Dexynivalenol und Butenolid via LC-MS/MS (2.2.9.11) wurden ca. 100 mg desselben gemörsterten Materials eingesetzt. Die detektierten Mengen wurden hernach ebenfalls mittels qRT-PCR auf die gemessene Menge an pilzlichem β -Tubulin in der gDNA normalisiert (Voigt et al. 2007).

2.2.9.2 Pathogenitätstests auf Weizen mit *F. graminearum*

Das für die Infektionsstudien verwendete Weizenkultivar „Nandu“ (Lochow-Petkus, Bergen-Wohlde, Deutschland) wurde in einer Wachstumskammer für ca. 6 Wochen bei 18-20 °C mit 70% relativer Feuchte und einer Photoperiode von 16 Stunden bis zur Blüte kultiviert. Die Pflanzen wurden in der Wachstumsphase 65-69 nach Zadoks inokuliert (Zadoks et al. 1974). Hierfür wurden jeweils 10 μ l einer Konidiensuspension (20 Konidien / μ l) oder 10 μ l ddH₂O (Kontrolle) zwischen die Palea und das Lemma einer Weizenblüte gegeben (s. Abb. 5).

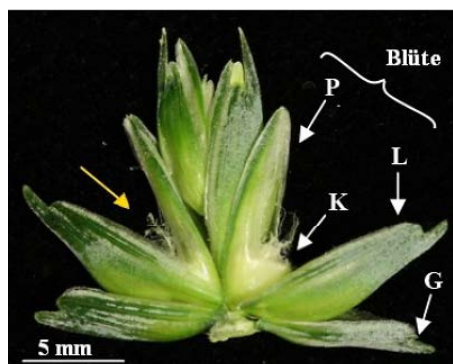


Abb. 5: Aufbau einer Weizenblüte. P = Palea, L = Lemma, K = Karyopse, G = Gluma. Der gelbe Pfeil deutet auf den Ort der Inokulation.

Je Ähre wurden zwei gegenüberliegende Blüten in der Ährenmitte inokuliert. Um eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit für die Primärinfektion zu gewährleisten, wurden mit

1-2 ml Wasser benetzte Plastiktüten über die inokulierten Ähren gestülpt und für 3 Tage über den Ähren belassen. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach insgesamt 21 Tagen nach der Inokulation bzw. nach 5 Tagen, um die inokulierten Blüten für die bereits beschriebene Quantifizierung oder für histologische Untersuchungen zu verwenden.

2.2.9.3 Histologische Untersuchung von infizierten Weizenähren

Um den Infektionsweg des Pilzes innerhalb einer Weizenähre zu untersuchen, wurde eine Blüte pro Weizenähre wie bereits beschrieben inokuliert und für 5 statt 21 Tage in der Infektionskammer belassen (2.2.9.2). Nach der Ernte der inokulierten Ähren wurden Längsschnitte durch die komplette Ähre durchgeführt. Durch die vorhandene Integration des rot fluoreszierenden Protein DsRed sowohl im 8/1 Wildtyp als auch in allen generierten Mutanten konnte der Pilz fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des MZ FLIII (Leica, Wetzlar, Deutschland) Stereomikroskops visualisiert werden. Unter Einsatz des DsRed-Filtersystems konnte das DsRed Fluorophor bei einer Wellenlänge von 545 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 620 nm detektiert werden. Es wurden serielle Bildaufnahmen des infizierten Bereiches der Ähre aufgenommen und mit Hilfe des Programmes „Image Composite Editor“ (ICE, Microsoft) zusammengefügt. Pro untersuchten Pilzstamm wurden in mindestens 2 unabhängigen Versuchen jeweils 3 bis 4 Weizenähren inokuliert und analysiert.

2.2.9.4 Chemische Komplementation und Vorbehandlung von Weizenähren mit synthetischem Butenolid

Für die chemische Komplementation einer Δ But Mutante mit synthetischen Butenolid wurde zunächst sowohl mit dem 8/1_DsRed als Kontrolle, als auch mit einer Δ But-Mutante wie zuvor beschrieben inokuliert (2.2.9.2) und 24 Stunden später 10 μ l des verdünnten Butenolids (100 ng/ml) in die bereits mit Konidien inokulierten Blüten gegeben.

Für die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid wurden zunächst 10 μ l des Metabolits in einer Konzentration von 50 ng/ml für die Inokulation verwendet und 24 Stunden später mit Konidien des 8/1_DsRed Stammes und einer Δ But Mutante inokuliert.

Die Auswertung beider Experimente erfolgte nach 5 Tagen durch sowohl eine molekularbiologische Quantifizierung des Pilzes (2.2.9.1, 3 biologische Replikate mit je 4 inokulierten Blüten) als auch durch eine histologische Untersuchung der Weizenähre (2.2.9.3, jeweils min. 3 biologische Replikate). Die Signifikanz der Ergebnisse der Quantifizierung wurde mittels Student's *t*-Test bestimmt.

2.2.9.5 Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Weizenvorspelzen nach Vorbehandlung mit synthetischem Butenolid bzw. nach der Infektion mit *F. graminearum*

PBS Puffer	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	2 mM KH ₂ PO ₄

Die mitochondriale Respiration in Weizenvorspelzen (Spelzen) wurde mit einem „XF24 extracellular flux analyzer“ (Seahorse Bioscience, North Billerica, Vereinigte Staaten von Amerika) gemessen. Die Messung der mitochondrialen Aktivität wurde in Kooperation mit Herrn Daniel Schniertschauer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Bergemann (Universität Albstadt-Sigmaringen) durchgeführt.

Weizenblüten wurden mit einer Rasierklinge von einer Ähre abgetrennt und die Vorspelze aus den Blüten isoliert. Zur Vorbereitung wurden die Vorspelzen 5× in 1× PBS gewaschen. Nachdem sowohl der untere, als auch der obere Bereich der Vorspelzen entfernt wurde, erfolgte ein weiterer Waschschrift in 1× PBS. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Vorspelzen in einer Petrischale mit Assay-Medium gelagert. Es folgte das Auslegen der Vorspelzen mit der konkav-gewölbten Seite nach unten auf ein Netzchen (1 Spelze/Netzchen) einer „Islet Capture-Plate“ (Seahorse) und der Zugabe von entweder 450 µl reinem Assay-Medium (Kontrolle) oder mit synthetischem Butenolid versetzten Assay Medium (Endkonzentration 80 µg/ml). Die Inkubationszeiten in Assay-Medium + Butenolid lagen bei 30, 60 und 180 min vor der Messung. Die Kontroll-Vorspelzen wurden für 180 min inkubiert. Bis zur Messung wurden die Vorspelzen bei 37 °C und 0% CO₂ gelagert. Kurz vor der Messung wurde das alte durch neues Assay-Medium ersetzt.

Neben der Bestimmung der mitochondrialen Respiration in Butenolid-behandelten und unbehandelten Spelzen wurden ebenfalls mit dem Wildtyp und einer ΔBut Mutante infizierte Weizenspelzen für die Messungen verwendet. Die Spelzen wurden wie zuvor in diesem Kapitel beschrieben präpariert und anschließend mit 100 Konidien der ΔBut-3 Mutante bzw. dem 8/1_DsRed Stamm inokuliert. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage bei 21 °C und einer Photoperiode von 16 Std. ehe ausgewählte Spelzen für den Versand vorbereitet und verschickt wurden. Bei der Auswahl der Spelzen wurden solche verwendet, die noch kein nekrotisches Gewebe aufwiesen. Als Kontrolle wurden mit sterilem ddH₂O inokulierte Vorspelzen verwendet.

Es erfolgte zunächst die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (eng. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Dadurch konnte die basale Respiration bestimmt werden, welche sich aus dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (z. B. für Oxidationsprozesse) zusammensetzt. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (A), 80 (B), 110 (C) min nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium dann folgende Substanzen hinzugefügt:

- | | |
|---|--|
| • A: Oligomycin, 50µl
[40µM bzw. 60µM] | 4 µM Spelzen mit/ohne Butenolid
6 µM infizierte Spelzen |
| • B: FCCP, 55µl
[40µM, bzw. 60µM] | 4µM Spelzen mit/ohne Butenolid
6µM infizierte Spelzen |

- C: Rotenon & Antimycin, 60 μ l 4 μ M Spelzen mit/ohne Butenolid
[40 μ M bzw. 60 μ M] 6 μ M infizierte Spelzen

Der Sauerstoffverbrauch einer Zelle kann durch die Zugabe von diesen spezifischen Inhibitoren der Atmungskette unterbrochen oder erhöht werden (s. Abb 6). Dies ermöglicht es, die Effizienz der einzelnen Komplexe innerhalb der Atmungskette zu bestimmen.

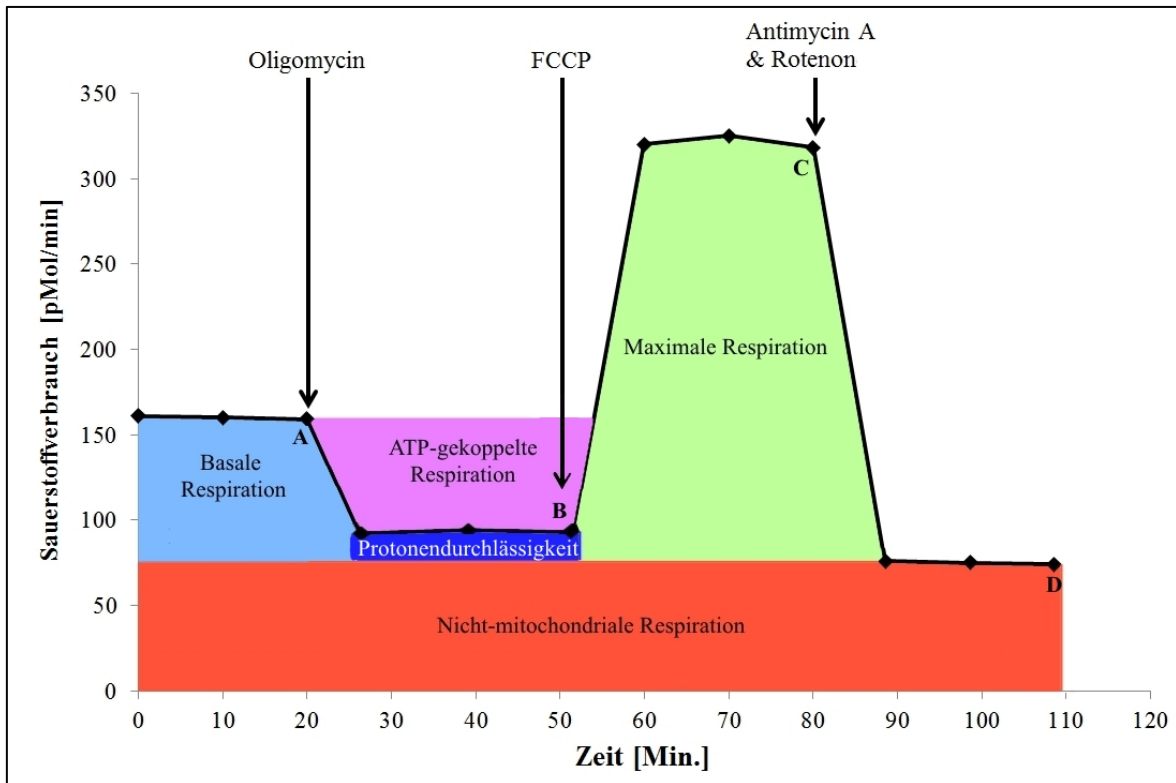


Abb. 6: Schematische Darstellung des Messprinzips an einem „XF24 extracellular flux analyzer“ (Seahorse Bioscience, North Billerica, Vereinigte Staaten von Amerika) mit dem XF Cell Mito Stress-Kit (Abbildung verändert nach: Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Manual).

Oligomycin blockiert die F_0 -Untereinheit der ATP-Synthase. Die Abnahme der Respiration kann somit als ein Maß für die ATP-Produktion der Mitochondrien angesehen werden. Die Entkopplung der Atmungskette durch das Protonophor FCCP (Cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) ermöglicht es, die maximale Respiration unabhängig vom Protonengradienten zu bestimmen. Zuletzt werden durch die Zugabe von Rotenone und Antimycin die Komplexe I und II, also die mitochondriale Respiration, geblockt. Der verbleibende Sauerstoffverbrauch ist somit auf die nicht-mitochondriale Respiration zurückzuführen. Anhand des gemessenen Sauerstoffverbrauches vor den Zugaben der jeweiligen Inhibitoren (s. Abb. 6, A-D) können die einzelnen Aspekte der Atmung durch die Bildung ihrer Differenz berechnet werden.

Im Folgenden wird aufgeführt, welche Werte hierfür jeweils verwendet wurden:

- Basale Respiration = A
- Mitochondriale Respiration = A - D
- ATP-gekoppelte Respiration = A - B
- Protonendurchlässigkeit = B - D
- Maximale Respiration = C - D
- Nicht-mitochondriale Respiration = D

Alle Messungen eines Versuchsansatzes wurden in mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 (mit/ohne Butenolid) bzw. 14 (infizierte Spelzen/Wasserkontrolle) biologischen Replikaten durchgeführt.

Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und die Signifikanz mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm) bestimmt.

2.2.9.6 Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung zur Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Für die Überprüfung, ob das von *F. graminearum* produzierte Butenolid die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. ROS, reactive oxygen species) innerhalb von Pflanzenzellen beeinflusst, wurde eine Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung durchgeführt. Mit Hilfe dieses Stoffes können Superoxid-Anionen (O_2^-) detektiert werden. NBT reagiert mit O_2^- , wobei sich ein blaues, unlösliches Präzipitat bildet. Je nach Intensität kann auf eine stärkere oder schwächere Reaktion rückgeschlossen werden.

Es wurden Vorspelzen von Weizenblüten präpariert und anschließend für 15 min mit sterilem ddH₂O gewaschen, um mögliche Pollenrückstände zu entfernen. Die gewaschenen Vorspelzen wurden dann entweder für 3 Std in 1 ml sterilem ddH₂O (Kontrolle) oder in 1 ml 80 µg/ml Butenolid-Lösung inkubiert. Es folgte die NBT-Färbung in einer 0,2%igen NBT-Lösung (2% NBT in ddH₂O als Stocklösung) für 45 min. Als weitere Kontrolle wurden Vorspelzen direkt nach dem Waschen ohne weitere Inkubation angefärbt.

2.2.9.7 Untersuchungen zur Wirkung von Butenolid auf das Wachstum von Pilzen und Bakterien

Um zu überprüfen, ob das von *F. graminearum* produzierte Sekundärmetabolit Butenolid eine Wirkung auf das Wachstum von Bakterien, Hefen und anderer phytopathogener Pilze hat, wurden Wachstumsversuche durchgeführt. Verwendete Medien und Kultivierungsbedingungen sind der Tabelle 7 (2.2.2) zu entnehmen.

Es wurden über-Nacht-Kulturen der Bakterienstämme erstellt und die OD₅₉₅ am Folgetag mit einem Photometer (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) ermittelt. Die Bakteriensuspensionen wurden mit dem entsprechenden Medium auf eine OD₅₉₅ = 1 verdünnt. In eine transparente 96-Kavitäten Platte wurden 200 µl des jeweiligen Mediums

vorgelegt und entweder mit 3,2 µl sterilem ddH₂O (Kontrolle I) oder Butenolid (80 µg/ml Enzkonzentration) versetzt. Eine Medium-Kontrolle ohne Zusätze und Zellen wurde ebenfalls durchgeführt. Die Ansätze wurden mit jeweils 0,75 µl der Bakteriensuspension inokuliert und für 18 Std. bei 28 °C bzw. 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Bestimmung der OD₅₉₅ erfolgte mit Hilfe des „Mithras² LB 943“ (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) unter Verwendung des Programmes „MikroWin 2010“ (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland). Für die Absorptionsmessung wurde der Anregungsfilter „600 (x10)“ verwendet, welcher die Absorptionen von 595 bis 605 nm detektieren kann. Pro verwendeten Bakterien- bzw. Hefestamm wurden 3 biologische und 3 technische Replikate sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Butenolid durchgeführt.

Die für diesen Versuch verwendeten Pilzstämme exprimierten alle das grün fluoreszierende Protein GFP. Der Versuchsaufbau glich dem zuvor beschriebenen mit folgenden Abweichungen: Anstatt einer transparenten 96-Kavitäten Platte wurde eine schwarze verwendet. Als Medium wurde MM verwendet (2.2.2), welches mit einem Inokulum bestehend aus 400 Konidien (20 µl einer 20 Konidien/µl Suspension) beimpft wurde. Das Wachstum wurde anhand der messbaren GFP-Fluoreszenz bestimmt. Hierfür wurde ebenfalls der „Mithras² LB 943“ verwendet. Die genutzten Filtersysteme besaßen eine Anregungswellenlänge von 460 (x10) nm und eine Emissionswellenlänge von 520 (x10) nm. Die Messungen erfolgten 24 und 48 Std. nach der Inokulation (hpi, **h**ours **p**ost **i**noculation). Für jedes getestete Phytopathogen wurden jeweils 6 biologische und 3 technische Replikate sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Butenolid durchgeführt.

Für beide Experimente wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und die Signifikanz mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm) bestimmt.

2.2.9.8 Untersuchung zur Wirkung von Butenolid auf die Regeneration von Protoplasten von *F. graminearum*

Im zuvor beschriebenen Kapitel ging es um die Wirkung von Butenolid auf Bakterien, Hefen und filamentöse Pilze. Eine Gemeinsamkeit dieser Organismen ist das Vorhandensein einer Zellwand. Um zu überprüfen, ob die Wirkung von Butenolid auf Zellen ohne Zellwand vergleichbar zum vorher beschriebenen Experiment ist, wurden Protoplasten des *F. graminearum* Stammes 8/1_DsRed wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben erstellt.

1 ml Protoplasten (5×10^6 , in TB3-Puffer) des 8/1_DsRed Stammes wurde mit 1 ml 160 µg/ml Butenolid in TB3-Puffer (= Endkonzentration 80 µg/ml), bzw. mit TB3-Puffer ohne Butenolid versetzt. Die Konzentration der Protoplasten lag somit bei 5×10^4 Protoplasten/ml.

Die Regeneration der Protoplasten erfolgte über Nacht bei 28 °C und 80 rpm in einem 50 ml Reaktionsgefäß. Am Folgetag wurden 5.000 (100 µl) bzw. 15.000 Protoplasten (300 µl) des jeweiligen Ansatzes zu 50 ml TB3-Agar gegeben, vermischt und auf 5 Petrischalen á 10 ml aufgeteilt. Pro Petrischale und verwendeter 10 ml wurden so jeweils ca. 1/5 der insgesamt eingesetzten Protoplasten ausplattiert (1.000 bzw. 3.000). Am Folgetag wurden die Platten dokumentiert und erhaltene Kolonien ausgezählt. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test bestimmt.

2.2.9.9 Extraktion des Polyketids Aurofusarin (AUR) aus dem *F. graminearum* Wildtypstamm 8/1 und einer AUR-defizienten Mutante

Kaliumphosphat-Puffer	1M K ₂ HPO ₄
(pH 7)	1M KH ₂ PO ₄

Für die Extraktion des Polyketids Aurofusarin (AUR) wurden CM-Kulturen wie zuvor beschrieben mit entweder dem 8/1-Stamm oder einer Δ pkS12 Mutante beimpft (2.2.2) und für 4 Tage inkubiert. Durch die Deletion von FgPKS12 wird AUR nicht mehr synthetisiert. Das Myzel wurde anschließend geerntet, mit 100 ml sterilem ddH₂O gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. 1 g Myzel wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) versetzt. Nach der Zugabe zweier Metallperlen ($\varnothing$ 3mm) wurde das Myzel für 15 min in einer Schwingmühle zerkleinert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und mit einem 0,22 μ m Millex®GP Filter steril filtriert.

2.2.9.10 Untersuchungen zur Wirkung von Aurofusarin auf das Wachstum von gram-negativen Bakterien

Wie zuvor für das Butenolid sollte das Polyketid Aurofusarin aus *F. graminearum* ebenfalls auf dessen Wirkung auf das Wachstum gram-negativer Bakterien untersucht werden. Hierfür wurden über-Nacht Kulturen der Bakterien *P. fluorescens*, *Janthino* HH102 und *Rhizobium* sp. NG234 wie zuvor beschrieben angezogen (Tab. 7, 2.2.2). Für die Testkulturen wurde die OD₅₉₅ am Folgetag mit einem Photometer (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech) ermittelt und auf eine OD₅₉₅ = 3 eingestellt.

15 μ l der Bakteriensuspension wurden anschließend für die Inokulation von 4 ml des entsprechenden Mediums verwendet. Es folgte die Zugabe von entweder 200 μ l des 8/1- oder Δ pkS12 Extraktes (2.2.9.9) oder des Extraktionsmittels (Kalium-Phosphat-Puffer) als Kontrolle. Die Kulturen wurden wie zu vor beschrieben inkubiert (2.2.2). Am nächsten Tag wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Pro analysierter Bedingung und Bakterienstamm wurden 3 biologische Replikate mit jeweils 3 technischen Replikaten angefertigt.

2.2.9.11 LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Deoxynivalenol und Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial und Kulturüberständen

Die Analyse von Deoxynivalenol (DON) und Butenolid (BUT) in infiziertem Pflanzenmaterial und Kulturüberständen wurde mittels LC-MS/MS von Professor Dr. Rainer Schuhmacher (Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich) durchgeführt. Hierfür wurden zum einen Weizenpflanzen mit fast allen in der Arbeit erstellten und charakterisierten Mutanten und mit dem 8/1_DsRed Stamm inokuliert (2.2.9.2), nach 5 Tagen geerntet (inokulierte Blüten und angrenzende Internodien) und das unter Stickstoff gemörserte Material bei -70 °C gelagert. Für den Transport der Proben zum Ort der Analyse wurden diese auf Trockeneis verschickt.

Die Durchführung der Messung erfolgte wie in Malachova et al., (2014) beschrieben. Im Folgenden ist die Vorbereitung aller in dieser Arbeit analysierten Proben für die LC-MS/MS Analyse aufgelistet:

- ca. 100 mg Pflanzenmaterial mit 500 µl Extraktionsmittel (MeOH/ Acetonitril/ ddH₂O, 2:2:1 v/v/v) versetzen
- 30 sek. kräftig schütteln
- Behandlung für 15 min in einem Ultraschallbad (Bandelin; Sonorex Digiplus DL 225 H)
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min bei 4 °C (Beckman Coulter; Allegra X-30 R Centrifuge)
- Überführung des Überstandes in ein 2 ml Reaktionsgefäß
- Zentrifugation bei 20.000 rpm für 20 min bei 4 °C
- 300 µl des Überstandes in neues Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe von 150 µl ddH₂O
- 30 sek. Kräftig schütteln
- 190 µl der Probenlösung in HPLC Vial mit Insert transferieren und 10 µl interner Standard (L-But 600 ppb) hinzugeben
- Kurz kräftig schütteln

Die erhaltenen DON und BUT Werte wurden auf die quantifizierte Konzentration an Pilz gDNA (2.2.9.1) normalisiert.

Für die Analyse von Überständen wurden zu analysierende Pilzstämme wie in 2.2.2 beschrieben zunächst in CM kultiviert und anschließend in „modifiziertes MYRO“ Medium umgesetzt, um die Mykotoxinsynthese einzuleiten. Zu den Zeitpunkten 3, 4 und 6 dpi wurden 2 ml des Medium/Myzel Gemisches abgenommen, für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um alle Myzelrückstände zu entfernen wurden die Überstände nochmals mittels Myracloth gefiltert. Bis zum Versand wurden die Proben bei -20 °C gelagert und ebenfalls anschließend auf Trockeneis verschickt. Dort wurden die Proben folgendermaßen weiterbehandelt.

- Überführung von 350 µl Probenlösung in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen
- Zugabe von 150 µl Acetonitril (ACN)
- 30 sek. Kräftig mischen
- Zentrifugation bei 14.000 rpm für 30 min und 4 °C
- Überführung des Überstands in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen
- 95 µl Überstand in HPLC Vial mit Insert transferieren und 5 µl internen Standard hinzuzugeben (L-But 30 µg/l in Messlösung)
- kurz kräftig vermischen

2.2.9.12 Untersuchung des *in vitro* Wachstums unter oxidativen und osmotischen Stressbedingungen.

In diesen Versuchen sollte zum einen das Wachstum der Cerato-platanin- Mutanten (Cerato-platanin Protein, CPP; Δ FgCPP1; $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2}) im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm auf CM- Medium untersucht werden. Zusätzlich wurden sowohl der Referenzstamm, als auch die Mutanten auf CM- Festmedien mit einer Natriumchlorid-Konzentration von 1M kultiviert, um das Wachstumsverhalten in Hinsicht auf osmotischen Stress zu untersuchen. Es wurden außerdem Wachstumstests unter oxidativem Stress durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (10 mM; 15 mM; 20 mM) verwendet. Die Starterplatten wurden mit 200 Konidien inokuliert und 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden anschließend Mycel/Agar-Blöcke aus der äußeren Wachstumszone der Kolonie gestanzt und auf die Testplatten umgesetzt (1 Block pro Platte). Diese wurden ebenfalls für 3 Tage bei 28 °C kultiviert. Es folgte die Dokumentation und Vermessung der Koloniegrößen. Pro untersuchtem Stamm und getesteter Bedingung wurden 3 technische Replikate angefertigt und ausgewertet.

2.2.9.13 Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Identifizierung und den Vergleich von Infektionsstrukturen der Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ CPP_{1,2} Mutanten und des 8/1_DsRed Stammes auf Weizenvorspelzen wurde das „Axio Imager Z1“ Mikroskop (Zeiss, München, Deutschland) verwendet. Da die Deletionen der FgCPPs im 8/1_DsRed Stamm erfolgte können diese unter Verwendung des DsRed-Filtersystems in einem Bereich von 538 nm bis 562 nm angeregt und die Fluoreszenzemission von 570 nm bis 640 nm detektiert werden.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte der Weizenblüteninfektion durch den Pilz *Fusarium graminearum* untersucht. Die erste Phase der Infektion zeichnet sich zunächst durch die Bildung von Laufhyphen aus, die es dem Pilz ermöglichen, sich auf pflanzlichem Gewebe auszubreiten. Daraufhin wird die Bildung von Infektionsstrukturen, wie den Infektionskissen, initiiert (Boenisch & Schäfer, 2011), mit denen das pflanzliche Gewebe durchdrungen und kolonisiert werden kann. Durch die Analyse eines differentiellen Transkriptoms konnten deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Strukturen beobachtet werden (unveröffentlichte Daten, AG Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg). Des Weiteren wurde das Transkriptom einer axenischen Kultur erstellt und ebenfalls mit dem der Infektionsstrukturen verglichen. So konnten Gene identifiziert werden, die ausschließlich oder sehr stark während des Infektionsprozesses induziert werden. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Validierung der erhaltenen Expressionsprofile in Infektionskissen, Laufhyphen und einer axenischen Kultur. Hierfür wurden fünf differentiell exprimierte Gene mittels qRT-PCR bezüglich ihrer Expression in den zuvor genannten Strukturen analysiert.

Nach der Ausbildung der Infektionsstrukturen kommt es zur Kolonisierung des Pflanzengewebes und zur Ausbreitung innerhalb der Pflanze. Dass Sekundärmetabolite schon zu Beginn der Kolonisierung von großer Bedeutung sind, konnte am Beispiel des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) gezeigt werden, da DON-defiziente Mutanten nicht über den Rachisknoten einer infizierten Blüte hinauswachsen können (Proctor et al. 1995, Maier et al. 2006). Doch welchen Einfluss DON auf die Phase vor der Überwindung des Rachisknotens hat, ist bisher nicht bekannt. Mittels histologischer Untersuchungen infizierter Weizenblüten und molekularer Quantifizierung des Pilzes wurde sich eben jene Phase, weiterhin als frühe Infektionsphase benannt, näher betrachtet.

Auf die frühe Phase der Infektion bezogen ist die Wirkung von Butenolid, einem weiteren Sekundärmetabolit aus *F. graminearum*, ebenfalls unerforscht. Es ist des Weiteren nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt der Infektion die Synthese eingeleitet wird. Der Nachweis dessen erfolgte via LC-MS/MS Analyse innerhalb einer Zeitreihe von 0 bis 5 Tagen nach der Inokulation. Mittels PCR wurde ebenfalls überprüft, welche Gene des Butenolid-Clusters zu den ausgewählten Zeitpunkten auf Transkriptionsebene nachweisbar waren.

Um zu analysieren, ob das Infektionsverhalten Butenolid-defizienter Mutanten in der frühen Phase der Infektion verändert ist, wurden Deletionsmutanten des Clustergens FGSG_08079 (Cytochrom P450) generiert und die Defizienz via LC-MS/MS verifiziert. Die Komplementation der Deletion fand sowohl genetisch, als auch chemisch statt. Im Zuge der Charakterisierung wurde zum einen die Virulenz in der frühen Infektionsphase, sowohl histologisch als auch molekularbiologisch, untersucht. Um herauszufinden, ob ein mögliches Angriffsziel des Butenolids pflanzliche Mitochondrien sind, wurde zum anderen der mitochondriale Sauerstoffverbrauch von Butenolid-behandelten Weizenvorspelzen untersucht. Hierbei wurden die unterschiedlichen Aspekte der mitochondrialen Atmung näher betrachtet.

Die konstitutive und möglicherweise frühere Synthese von Butenolid sollte ebenfalls induziert werden. Hierfür wurde der ORF des FGSG_08079 Gens unter die Kontrolle eines konstitutiven Promotors gesetzt. Die erhaltenen Mutanten erfuhren die gleiche Charakterisierung wie die zuvor beschriebenen Deletionsmutanten.

Im Kontext der frühen Infektionsphase verbleibend wurde zuletzt die Wirksamkeit von Butenolid sowohl auf andere phytopathogene Pilze, als auch auf Bakterien und Hefen näher untersucht. Ein antimikrobiell wirkendes Metabolit könnte gerade bei der Bekämpfung von Konkurrenten zu Beginn der Infektion von Vorteil sein.

Im Zuge dieser Analyse auf Bioaktivität wurde sich das Sekundärmetabolit Aurofusarin aus *F. graminearum*, ein Mykotoxin aus der Gruppe der Polyketide, ebenfalls betrachtet. Hier wurde der Einfluss auf gram-negative Bakterien näher untersucht.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit zwei Genen, die zu den Cerato-plataninen gehören. Da im Genom von *F. graminearum* fünf mögliche Cerato-platanin Proteine (CPP) anzufinden sind, wurden zum einen *in silico* Analysen und Sequenzvergleiche mit bereits bekannten und charakterisierten CPPs anderer Ascomyceten durchgeführt. Die Kandidatengene, die aus dieser Analyse hervorgegangen sind, wurden anschließend deletiert und charakterisiert.

3.1 Validierung eines differentiellen Transkriptoms mittels qRT-PCR

F. graminearum bildet während der frühen Infektionsphase unterschiedliche Infektionsstrukturen aus (Boenisch & Schäfer, 2011): So genannte Laufhyphen (LH), die für die epiphytische Ausbreitung auf der Pflanzenoberfläche zuständig sind, und komplexe Infektionsstrukturen, wie die Infektionskissen (IK), um das pflanzliche Gewebe zu durchdringen und es zu kolonisieren. Welche Faktoren für die Differenzierung zu IK wichtig sind und, welche Unterschiede es zwischen LH und IK gibt, ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Aus diesem Grunde wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wilhelm Schäfer (AG Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg) ein differentielles Transkriptom dieser Strukturen und einer axenischen Kultur (Myzel, MY) erstellt.

Die Validierung der dadurch erhaltenen Expressionsprofile wurde mit einer qRT-PCR Analyse von fünf differentiell exprimierten Genen durchgeführt. Die dazu benötigte cDNA entsprach der für die RNA-Sequenzierung verwendeten und wurde von Michael Mentges (AG Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Es wurde die Expression folgender Gene in IK, LH und MY untersucht: FgTRI5 (FGSG_03537), FgPKS12 (Polyketidsynthase 12; FGSG_02324), FgEF1 (FGSG_04213; Effektor 1) und zwei GABA-Transaminasen (FgGTA1, FGSG_05554; FgGTA2, FGSG_06751). Als Referenzgene wurden in allen durchgeführten qRT-PCR Reaktionen β -Tubulin (FGSG_06611), Ubiquitin (FGSG_10805) und Cofilin (FGSG_06245) verwendet. Um zu überprüfen, welche dieser Haushaltsgene für die anschließende Normierung der Expressionsanalysen am geeignetsten waren, wurde das Online-Tool „RefFinder“ verwendet. Dieses verwendet vier unterschiedliche Programme für diese Analyse. Es wurden insgesamt 162 Ct-Werte für jedes Haushaltsgen verwendet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Statistische Analyse von Ct-Werten der Haushaltsgene β -Tubulin, Cofilin und Ubiquitin. Mit dem Online-Tool „RefFinder“ wurden die Referenzgene β -Tubulin, Cofilin und Ubiquitin hinsichtlich ihrer Eignung als Referenzgen für die Expressionsanalyse in IK, LH und MY untersucht. In „RefFinder“ eingebettete und verwendete Programme sind: DeltaCT, Bestkeeper, normFinder und Genorm. Je niedriger der berechnete Wert, desto stabiler ist ein Gen als Haushaltsgen im Vergleich zu anderen.

Programm	β -Tubulin	Cofilin	Ubiquitin	Referenz
Delta CT	1,223	0,941	1,021	Silver et al. (2006)
BestKeeper	1,901	1,299	1,151	Pfaffl et al. (2004)
normFinder	1,109	0,275	0,686	Andersen et al. (2004)
Genorm	1,062	0,739	0,739	Vandesompele et al. (2002)

Die in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse geben die Stabilität eines Gens als Haushaltsgen wieder. Je kleiner der Wert, desto stabiler und geeigneter ist ein Gen für die Normierung von Expressionen als Referenzgen. Für jedes Programm zeigten sowohl Cofilin, als auch Ubiquitin die geringsten Werte und wurden aus diesem Grund als Haushaltsgene für die Expressionsanalyse der zu validierenden Gene verwendet.

Für die Berechnung der Expressionsstärke in einer Struktur (IK/ LH/ MY) im Vergleich zu einer anderen wurde das Programm REST-348 verwendet. Hier werden durch die qRT-PCR erhaltene Ct-Werte verglichen, auf die Expression der Haushaltsgene normiert und die Unterschiede in der Expressionsstärke berechnet. Es wurden folgende Vergleiche angestellt:

- IK zu LH (Abb. 7-A)
- IK zu MY (Abb. 7-B)
- LH zu MY (Abb. 7-C)

Pro Struktur wurden mindestens 2 biologische Replikate und 3 technische untersucht. Jedes biologische Replikat einer Struktur wurde mit denen der anderen verglichen. Zusätzlich dazu wurden unterschiedliche Kombinationen der Haushaltsgene für die Normalisierung der Expressionen verwendet:

- Ubiquitin
- Cofilin
- Ubiquitin und Cofilin

Das Ergebnis der Validierung ist in der Abbildung 7 dargestellt.

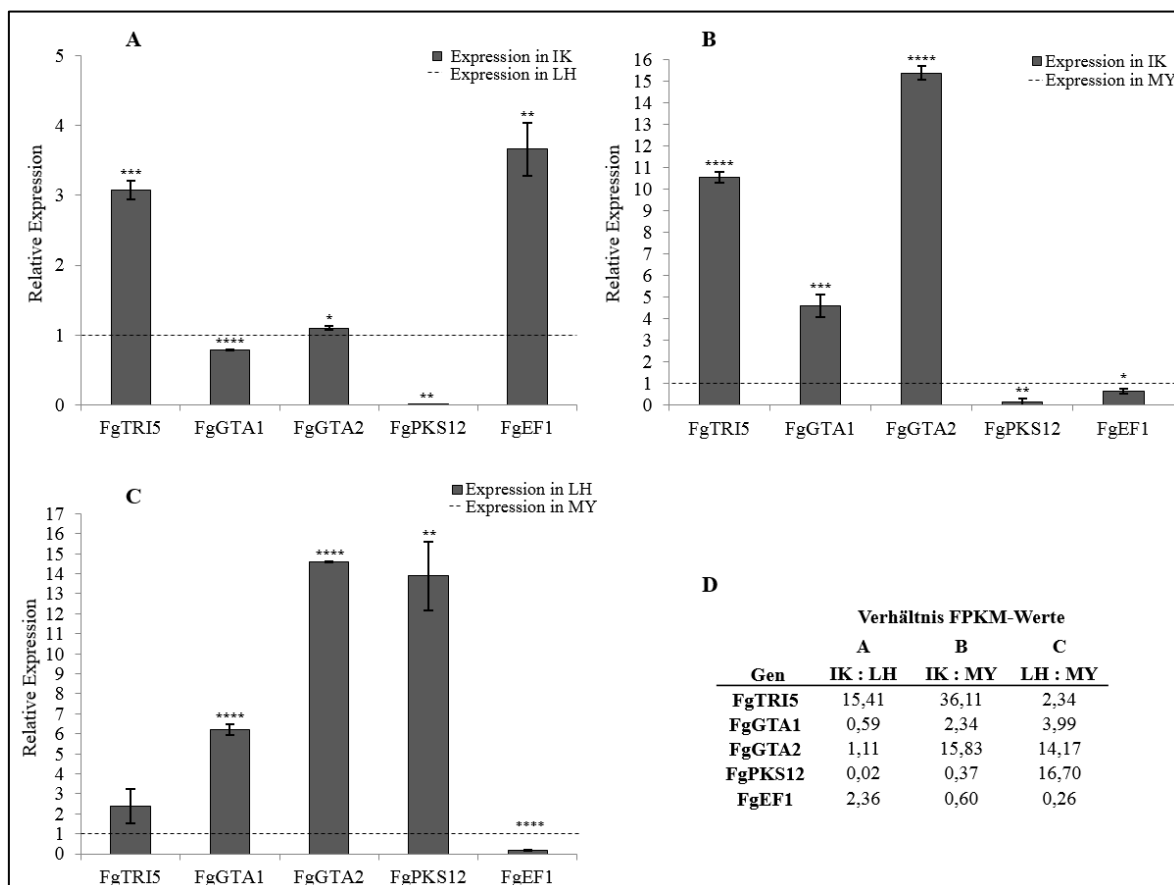


Abb. 7: qRT-PCR differentiell exprimierter Gene zur Validierung von Transkriptomdaten. Für die Validierung des differentiellen Transkriptoms aus Infektionskissen (IK), Laufhyphen (LH) und einer axenischen Kultur (Myzel, MY) wurde die relative Expression der Gene FgTRI5 (FGSG_03537), FgGTA1 (F. graminearum GABA-Aminotransferase 1; FGSG_05554), FgGTA2 (FGSG_06751), FgPKS12 (F. graminearum Polyketidsynthase 12, FGSG_02324) und FgEF1 (F. graminearum Effektor 1, FGSG_04213) via qRT-PCR ermittelt und auf die Ubiquitin bzw. Cofilin Expression normalisiert. Als Template diente aus IK, LH und MY isolierte mRNA, die in cDNA umgeschrieben wurde. Diese wurde ebenfalls für die Erstellung des Transkriptoms verwendet (zur Verfügung gestellt von Michael Mentges). Die Expression in entweder IK oder LH wurde mit der Expression in LH bzw. MY verglichen (A-C). Relative Expression ausgewählter Gene in IK im Vergleich zu LH (A) oder MY (B) bzw. LH im Vergleich zu MY (C). D Verhältnisse von FPKM-Werten (engl. Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped, Fragmente pro Exon-Kilobase pro Millionen annotierter Fragmente) für alle getesteten Gene von einer analysierten Struktur zur anderen. Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder. Es wurden mindestens zwei biologische Replikate pro analysierter cDNA mit jeweils 3 technischen Replikaten verwendet. Die Signifikanz wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA bestimmt (ANOVA-Bonferroni-Holm; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Für die Überprüfung der Validierungsergebnisse wurde in der Abbildung 7-D zusätzlich das Verhältnis eines FPKM-Wertes eines Gens in einer Struktur zu einer anderen aufgelistet (Bsp. FPKM-Wert in IK : FPKM-Wert in LH; zur Verfügung gestellt von Michael Mentges, AG Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg). Diese geben an, wie oft ein Genfragment während des Sequenzierungsprozesses detektiert werden konnte. Eine höhere FPKM Zahl ist auf eine erhöhte Transkriptmenge zurückzuführen. Folgerichtig zeigen Werte aus Abbildung 7-D, die größer als 1 sind, eine Hochregulierung an.

Die Abbildung 7-A zeigt die Expressionen der Validierungsgene in IK im Vergleich zu LH. Es konnte eine signifikant stärkere Expression der Gene FgTRI5, FgGTA2 und FgEF1 ermittelt werden. Dies spiegelt die Ergebnisse der Transkriptomsequenzierung wieder.

Hier konnte ein höherer Wert für alle drei Gene in IK ermittelt werden. Gegenteiliges ist für die Gene FgGTA1 und FgPKS12 zu beobachten. Hier gibt das berechnete Verhältnis der FPKM-Werte eine Runterregulation in IK im Vergleich zu LH an. Die qRT-PCR hat dazu passend eine signifikante Runterregulation dieser Gene in IK ergeben.

Betrachtet man sich die Expression in IK im Vergleich zu MY (Abb. 7-B) konnte sowohl für FgTRI5, als auch für die beiden GABA-Transaminasen FgGTA1 und FgGTA2 eine signifikant höhere Expression in IK ermittelt werden. Auch in diesem Fall passt das Ergebnis der qRT-PCR zu den FPKM Werten der Transkriptomsequenzierung. In IK ist der FPKM-Wert im Vergleich zu LH erhöht. Das qRT-PCR Ergebnis für FgPKS12 und FgEF1 gibt ebenfalls das Ergebnis des Transkriptoms wieder. Die Expression beider Gene ist in IK signifikant im Vergleich zu MY verringert und auch der FPKM-Vergleich zeigt eine Runterregulation in MY.

Zuletzt wurden Expressionsunterschiede zwischen LH und MY näher betrachtet (Abb. 7-C). Laut der FPKM-Vergleiche weisen die Gene FgTRI5, FgGTA1, FgGTA2 und FgPKS12 deutlich mehr Transkript in LH auf als in MY. Für FgEF1 verhält es sich gegensätzlich. Hier wurde mehr Transkript in MY als in LH nachgewiesen. Diese Unterschiede konnten ebenfalls via qRT-PCR nachgewiesen werden. FgTRI5, FgGTA1, FgGTA2 und FgPKS12 sind signifikant stärker, FgEF1 signifikant schwächer in LH exprimiert als in MY.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen, dass die Expressionsprofile der fünf differentiell exprimierten Gene die Ergebnisse des Transkriptoms in IK, LH und MY widerspiegeln, die generierten Transkriptomdaten somit validiert werden konnten.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Weizenblüteninfektion

3.2.1 Die DON-Synthese ist entscheidend für die frühe Phase der Infektion von Weizen

Wie eingangs erwähnt, ist DON ein wichtiger Virulenzfaktor für die Infektion von Weizen. Welche Auswirkungen das Fehlen von DON auf die frühe Infektionsphase hat ist bisher nicht bekannt. Um dies zu überprüfen wurden sowohl histologische Untersuchungen infizierter Weizenähren, als auch eine molekulare Quantifizierung des Pilzmaterials zur Verifizierung dieser Ergebnisse durchgeführt. Für die Histologie wurde eine Weizenblüte, für die Quantifizierung zwei Blüten pro Ähre mit Konidien der Δ Tri5_GFP Mutante bzw. des Referenzstammes 8/1_GFP inokuliert und nach 5 Tagen geerntet. Durch die Integration des grün fluoreszierenden Proteins GFP konnte der Infektionsverlauf beider Pilzstämme innerhalb der Pflanze visualisiert werden. Nach der Durchführung eines Längsschnitts durch die infizierten Blüten wurden serielle Bildaufnahmen des infizierten Bereiches der Ähre aufgenommen und zusammengefügt. Für die Quantifizierung wurde gDNA aus dem gemörserten Pflanze/Pilz Material isoliert und die Konzentration an pilzlicher gDNA mittels qRT-PCR anhand der Ct-Werte bestimmt. Die Ergebnisse beider Versuche sind in der Abbildung 8 dargestellt.

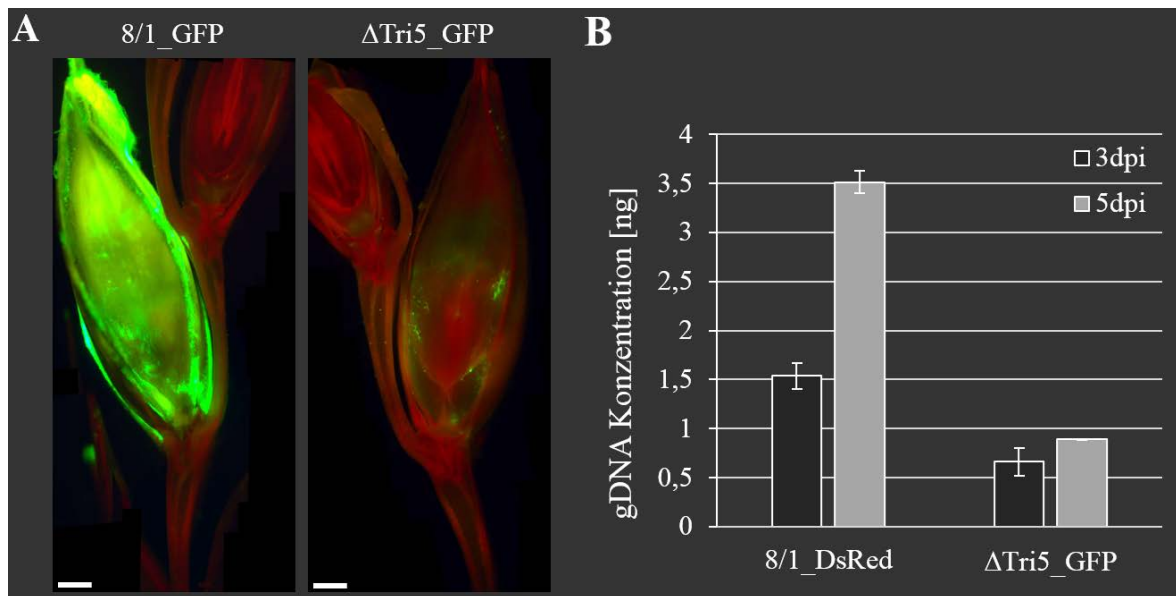


Abb. 8: Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B) von einer Δ Tri5_GFP Mutante und dem 8/1_GFP Stamm. **A** Histologische Untersuchung von Weizenähren, 5 Tage nach der Inokulation (dpi = days post inoculation, Tage nach der Inokulation). Das Pilzwachstum konnte anhand einer konstitutiven GFP Expression innerhalb des infizierten Bereiches visualisiert werden. Längenmaßstab: 1 mm. **B** Molekulare Quantifizierung von Pilz-gDNA. Die Ernte erfolgte nach 3 und nach 5 Tagen. Aus dem Pflanze/Pilz-Material wurde gDNA isoliert und die Konzentration an pilzlicher gDNA mittels qRT-PCR und Pilz-spezifischen β -Tubulin Primern bestimmt. Pro Stamm wurden min. 3 biologische Replikate untersucht. Für die Quantifizierung via qRT-PCR Analyse wurden jeweils 3 technische Replikate pro biologischem Replikat angefertigt. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm) durchgeführt.

Anhand der Abbildung 8-A kann beobachtet werden, dass die Δ Tri5_GFP Mutante nur in geringem Maße detektiert werden kann, wohingegen die Fluoreszenz des 8/1_GFP Stammes deutlich zu erkennen ist. Die geringe Fluoreszenz der Mutante scheint auf ein verringertes Wachstum innerhalb der Weizenblüte zu deuten. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch die molekulare Quantifizierung (Abb. 8-B). Bereits nach 3 dpi zeichnet sich eine Verringerung des nachgewiesenen Pilzmaterials für die Δ Tri5_GFP Mutante (0,6 ng) im Vergleich zum Referenzstamm (1,5 ng) ab. Dieser Unterschied ist nach 5 dpi noch deutlicher. Für den 8/1_DsRed Stamm konnte mehr als die dreifache gDNA Konzentration nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Fehlen von DON bereits in der frühen Infektionsphase zu einer reduzierten Virulenz der Δ Tri5_GFP Mutante im Vergleich zum 8/1_GFP Stamm führt.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der Reduktion der Virulenz um eine generelle Verringerung des Wachstums handelt, wurden der 8/1_DsRed und der Δ Tri5_GFP Stamm auf CM Platten für 3 Tage kultiviert (Abb. 9).

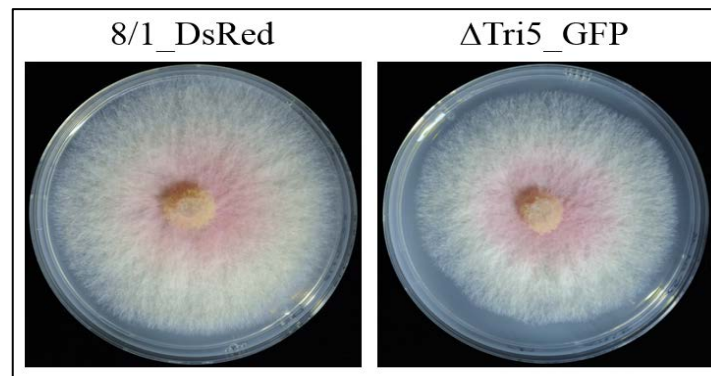


Abb. 9 Überprüfung des *in vitro* Wachstums auf CM-Agar. 200 Konidien des 8/1_DsRed Stammes und einer Δ Tri5_GFP Mutante wurden in das Zentrum einer CM-Agarplatte pipettiert und für 3 Tage bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Pro Stamm wurden drei technische Replikate angefertigt.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, zeigt die Mutante keine Verringerung im *in vitro* Wachstum. Die nachgewiesene Reduktion *in planta* ist demnach auf keinen generellen Wachstumsdefekt zurückzuführen.

Dass die DON-Synthese durch die Deletion des Gens Tri5 unterbunden wird ist bekannt (Proctor et al. 1995). Ob dies einen Einfluss auf die Synthese anderer Sekundärmetabolite hat, jedoch nicht. In der frühen Infektionsphase von Weizen konnten bereits Transkripte aller Butenolid-Clustergene nachgewiesen werden (Sieber et al., 2014). Dass Butenolid in dieser Phase synthetisiert wird ist deshalb denkbar. Mittels LC-MS/MS Analyse wurde aus diesem Grund überprüft, ob das Fehlen von DON während der Weizenblüteninfektion einen Einfluss auf die Butenolid-Synthese hat. Die LC-MS/MS Analyse wurde von Professor Dr. Rainer Schuhmacher (Center for Analytical Chemistry, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich) durchgeführt. Hierfür wurde für die Δ Tri5_GFP Mutante dasselbe Material verwendet, welches auch in der molekularen Quantifizierung Verwendung fand. Die dort ermittelte Konzentration an pilzlicher gDNA wurde für die Normalisierung der Butenolid Konzentrationen verwendet (Voigt *et al.* 2007). Die Konzentrationen für die Referenzkontrolle waren die des 8/1_DsRed Stammes. Das Ergebnis ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid (BUT) in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf die Konzentration an pilzlicher gDNA. Für die LC-MS/MS Analyse (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich) wurden 100 mg infiziertes Pflanzenmaterial für die Bestimmung von Butenolid verwendet. Für die Normalisierung wurden die zuvor bestimmten gDNA Konzentrationen verwendet (Abb. 8). Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht.

Stamm	Replikatnr.	BUT [mg/kg]
8/1_DsRed	1	35,50
	2	33,04
	3	48,41
Δ Tri5_GFP	1	0,0
	2	1,2168
	3	7,9971

Die Tabelle 10 zeigt, dass die Butenolid-Konzentrationen für die Δ Tri5_GFP Mutante im Vergleich zur Referenz sehr niedrig sind. Für das erste biologische Replikat konnte kein Butenolid detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet zunächst darauf hin, dass das Fehlen von DON zu einer Reduktion der Butenolid-Synthese führt.

3.2.2 *In silico* Analyse der Butenolid-Clustergene

Gene, deren Produkte an der Synthese eines Sekundärmetabolits beteiligt sind, liegen in Pilzen meistens in einem Cluster vor. Sie sind im selben Genlokus lokalisiert und stehen unter der Kontrolle desselben Regulators (Keller & Hohn, 1997). Das Gencluster der Butenolid-Synthese besteht aus acht ko-regulierten Genen (Harris et al., 2006). Die Gen- und Proteinsequenzen und deren Anordnung im Genom von *F. graminearum* konnten der Datenbank „MIPS-Fusarium graminearum Database Pedant“ des Helmholtz Zentrums München (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>, Stand 05/2015) entnommen werden. Das Gencluster für die Butenolid-Synthese befindet sich subtelomer auf Chromosom 2. Die Abbildung 10 veranschaulicht die Aufstellung der Clustergene.

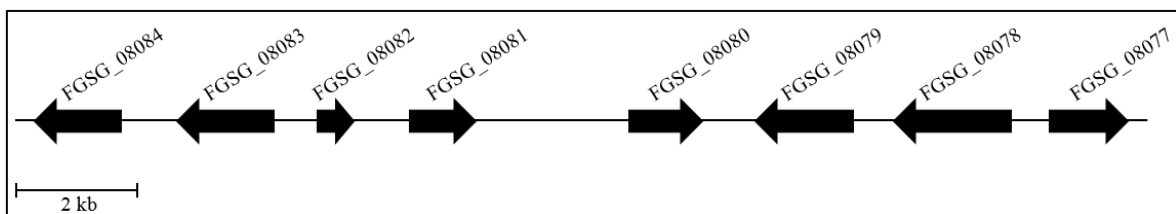


Abb. 10: Schematische Darstellung der genomischen Anordnung der Butenolid-Clustergene. Die Pfeilrichtung gibt die Richtung der Transkription an. Introns werden nicht angezeigt. Die genomische Anordnung der Butenolid-Clustergene von *F. graminearum* wurden der Datenbank „MIPS-Fusarium graminearum Database Pedant“ des Helmholtz Zentrums München (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>, Stand 05/2015) entnommen.

Keller und Hohn (1997) haben beschrieben, dass Sekundärmetabolit-Gencluster Gene unterschiedlicher Funktionalität enthalten, wie z.B. modifizierende Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Transporter. Die Proteinsequenzen aller Butenolid-Clustergene wurden somit zum einen hinsichtlich enthaltener Signalpeptide mit dem Tool „SignalP“ (Petersen et al., 2011) und zum anderen bezüglich vorkommender, funktioneller Domänen mit den „SMART analysis tool“ (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2014) und dem Online-Tool „MotifScan“ untersucht. Zusätzlich sollte unter Verwendung von „TargetP“ (Emanuelsson et al., 2000) überprüft werden, ob eine spezifische Lokalisation dieser Proteine bestimmt werden kann. Die *in silico* Untersuchungen zusammen mit den bereits verfügbaren Annotationen sollten Aufschluss über die Genfamilien und die Funktionen der einzelnen Gene geben.

Unter Verwendung von „TargetP“ konnte für fast alle Clustergene sowohl kein Signalpeptid, als auch kein spezifischer Bestimmungsort bzw. keine spezifische Lokalisation innerhalb der Zelle bestimmt werden. Einzig für FGSG_08079 konnte ein Signalpeptid vorhergesagt werden. Des Weiteren scheint es an einem Sekretionsweg beteiligt zu sein (TargetP Analyse). Die Analyse der Proteinsequenz von FGSG_08079 ergab eine

Transmembrandomäne am N-Terminus, gefolgt von einer Cytochrom P450 Domäne. Auch die InterPro Beschreibung definiert dieses Protein als ein Cytochrom P450. Weiterhin definiert die Datenbank „MIPS-*Fusarium graminearum* Database Pedant“ dieses Protein als eine Cytochrom P450 Benzoat-Monooxygenase. FGSG_08077 wird als eine NADH:Flavin Oxidoreductase bezeichnet. Die Analyse mit „SMART“ und „MotifScan“ hat ebenfalls ergeben, dass dieses Protein eine Oxidoreduktase-Domäne besitzt. Übereinstimmungen in der Annotierung und bestimmter Domänen konnten ebenfalls für FGSG_08078 (Amidase), FGSG_08081 (2-Oxoglutarat-Fe(II) Oxygenase), FGSG_08082 (Acetyltransferase), FGSG_08083 (Pyridoxal-Phosphat abhängige Decarboxylase) und FGSG_08084 (Monocarboxylat-Transporter mit einer „Major facilitator superfamily (MFS) Domäne). FGSG_08080 ist als „Protein mit einer Zn(II)₂Cys₆ DNA-Bindedomäne“ definiert. Die Analyse der Proteinsequenz hat ergeben, dass es sich bei dieser Domäne um einen zum Protein GAL4 ähnlichen Zn(II)₂Cys₆ Transkriptionsfaktor handelt. GAL4 ist ein regulatorisches Protein in *S. cerevisiae*. Es reguliert die Genexpression Galaktose-induzierter Gene und kommt nur in Pilzen vor (Johnston 1987; Johnston & Carlson 1992). Die Analyse des Butenolid-Clusters hat ergeben, dass sich dieses aus Genen unterschiedlicher Familien zusammensetzt. Es konnten neben modifizierenden Enzymen (FGSG_08077-FGSG_08079, FGSG_08081-FGSG_08083) auch ein Transkriptionsfaktor (FGSG_08080) und ein Transporter identifiziert werden.

3.2.3 Bestimmung des Butenolids im Zeitverlauf der frühen Infektion von *F. graminearum* auf Weizen

Der erste Schritt auf dem Weg zur Charakterisierung des von *F. graminearum* produzierten Sekundärmetabolites Butenolid war es herauszufinden, wann der in dieser Arbeit verwendete Stamm es während der frühen Infektionsphase von Weizen bildet. Hierfür wurden Weizenähren an zwei Blüten mit 200 Konidien punktinokuliert und zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4 und 5 dpi geerntet. Es folgten der Zellaufschluss unter Flüssigstickstoff und die Isolation von genomischer DNA mit anschließender Quantifizierung der Pilz-gDNA mittels qRT-PCR. Es kamen pilz-spezifische β -Tubulin Primer zum Einsatz. Die Bestimmung von Butenolid erfolgte mittels LC-MS/MS und wurde anschließend auf die gemessene Menge Pilz-DNA normalisiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf gemessene gDNA Konzentrationen. Inokulierte Weizenpflanzen wurden nach 1, 2, 3, 4 und 5 dpi geerntet. Aus ca. 20 mg Material wurde gDNA isoliert und mittels qRT-PCR die enthaltene Menge an Pilz gDNA bestimmt. 100 mg Material wurden für eine LC-MS/MS Analyse (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich) zur Bestimmung von Butenolid verwendet und auf die enthaltene gDNA-Konzentration normalisiert. Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht.

Zeitpunkt	Replikatnr.	Butenolid [mg/kg]	Zeitpunkt	Replikatnr.	Butenolid [mg/kg]
0 dpi	1	0,00	3 dpi	1	27,32
	2	0,00		2	43,01
	3	0,00		3	41,09
1 dpi	1	0,00	4 dpi	1	12,03
	2	0,00		2	55,59
	3	0,00		3	12,94
2 dpi	1	73,88	5 dpi	1	23,40
	2	22,86		2	8,96
	3	88,99		3	10,90

Die Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zeigen, dass sowohl direkt nach der Inokulation, als auch 24 Std. danach (1 dpi) kein Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial nachgewiesen werden kann. Ab 2 dpi mit dem 8/1_DsRed Stamm kann jedoch Butenolid nachgewiesen werden. Es fällt auf, dass die Butenolid-Konzentrationen innerhalb der biologischen Replikate schwanken. Des Weiteren nimmt die Konzentration ab 3 dpi ab.

Außerdem wurde mittels PCR überprüft, welche Transkripte der Butenolid-Clustergene nachgewiesen werden können. Hierfür wurde aus dem für die LC-MS/MS Analyse verwendeten Material RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR mit pilz-spezifischen Primern für alle acht Clustergene und β -Tubulin als Haushaltsgen durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 11 dargestellt.

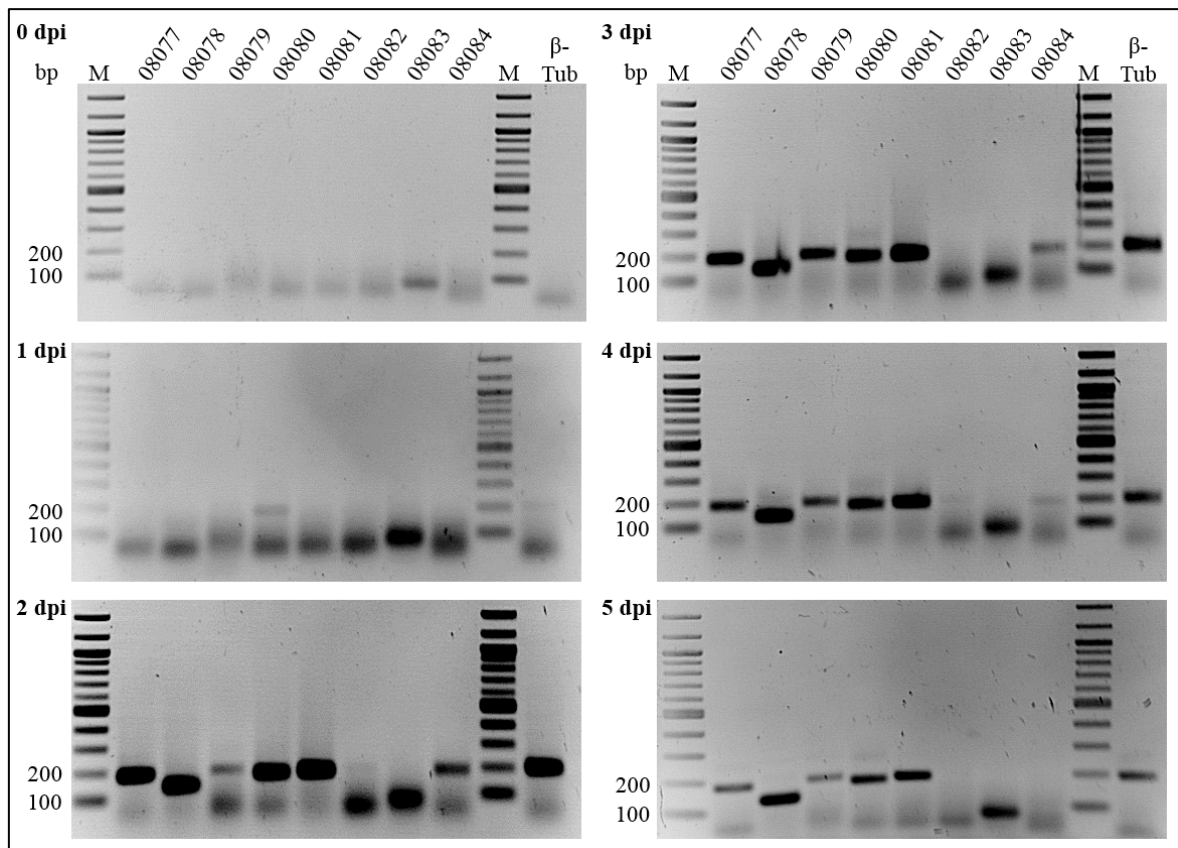


Abb. 11: PCR für den Transkriptnachweis der Butenolid Clustergene im Zeitverlauf der frühen Infektion von *F. graminearum* auf Weizen. Für den Nachweis der Transkripte aller Butenolid Clustergene und β -Tubulin wurde RNA aus infiziertem Pflanzenmaterial isoliert, welches zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation (1, 2, 3, 4, 5 dpi) mit dem 8/1_DsRed Stamm geerntet wurde. Hierbei handelte es sich um das gleiche Material, das für die LC-MS/MS Analyse verwendet wurde. Es wurde mRNA in cDNA umgeschrieben und als Template für eine PCR mit gen-spezifischen Primern (Tab. 4) verwendet. Als Referenzgen fungierte β -Tubulin. Es wurden 10 μ l der PCR-Produkte über ein 1,6% Agarosegel in $1\times$ TAE aufgetrennt. M = Marker 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs). Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt. Erwartete Fragmentgrößen: FGSG_08077:183 bp; FGSG_08078: 197 bp; FGSG_08079: 197 bp; FGSG_08080: 181 bp; FGSG_08081:190 bp; FGSG_08082: 190 bp; FGSG_08083: 198 bp; FGSG_08084: 185 bp.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, kann keinerlei Transkript sowohl für die Butenolid Clustergene, als auch für β -Tubulin direkt nach der Inokulation der Weizenblüten (0 dpi) nachgewiesen werden. Für FGSG_08083 scheint ein Fragment amplifiziert worden zu sein, welches kleiner als 100 bp ist. Da jedoch ein Fragment mit einer Größe von 198 bp erwartet wird kann es sich nicht um den Transkriptnachweis für FGSG_08083 handeln. Nach 24 Std. (1 dpi) allerdings kann eine Bande für das Gen FGSG_08080, ein $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ Transkriptionsfaktor, detektiert werden. Eine schwache Bande für β -Tubulin kann ebenfalls detektiert werden. Ab dem Zeitpunkt 2 dpi können sechs der acht Butenolid Clustergene auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Das Transkript des Gens FGSG_08082 ist nur als schwache Bande, FGSG_08083 ist nicht zu detektieren. Nach 3 dpi können FGSG_08082 (190 bp) und FGSG_08083 (198 bp) nicht via RT-PCR nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt 4 dpi sind weiterhin die zuvor genannten 6 Gene auf Transkriptebene nachweisbar (FGSG_08077 bis FGSG_08081, FGSG_08084).

Des Weiteren ist eine sehr schwache Bande für das Gen FGSG_08082 nachweisbar. Fünf Tage nach der Inokulation mit dem 8/1_DsRed Stamm sind Transkripte der Gene FGSG_08077 bis FGSG_08081 detektierbar.

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Pixelintensität der Banden und damit in der Transkriptmenge gibt, wurden diese mit dem Programm „ImageJ“ (Schneider et al., 2012) ermittelt. Es wurde das Verhältnis der Bandenintensität eines Clustergens zu der von β -Tubulin berechnet. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle 12 dargestellt. Des Weiteren wurden diese Veränderungen im Zeitverlauf graphisch in der Abbildung 12 dargestellt.

Tab. 12: Verhältnis von Bandenintensitäten der Butenolid-Clustergene zur Intensität von β -Tubulin Banden innerhalb eines 1,6% Agarosegels. Die Pixelintensitäten der Banden wurden mit dem Programm „ImageJ“ (Schneider et al., 2012) bestimmt. Hierfür wurden die Gelbilder der Zeitpunkte 1 – 5 dpi verwendet (s. Abb. 11). Die ermittelten Intensitäten pro Bande eines Clustergens zu einem Zeitpunkt wurde mit der Intensität der dazugehörigen β -Tubulin Bande ins Verhältnis gesetzt. Werte > 1 deuten auf eine höhere, Werte < 1 auf eine niedrigere Transkriptmenge im Vergleich zu β -Tubulin. Ein * gibt an, dass für diesen Wert keine Bande im Agarosegel nachgewiesen werden konnte.

Gen (FGSG_)	Verhältnis Bandenintensität Clustergen : β -Tubulin				
	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi
08077	0,043*	1,005	0,898	1,023	1,006
08078	0,085*	0,986	1,065	1,464	2,232
08079	0,072*	0,231	0,705	0,687	0,577
08080	3,604	0,833	0,754	1,158	1,303
08081	0,218*	0,925	0,931	1,455	1,448
08082	0,070*	0,018	0,002*	0,033	0,004*
08083	0,060*	0,003*	0,002*	0,002*	0,002*
08084	0,096*	0,480	0,259	0,103	0,005*

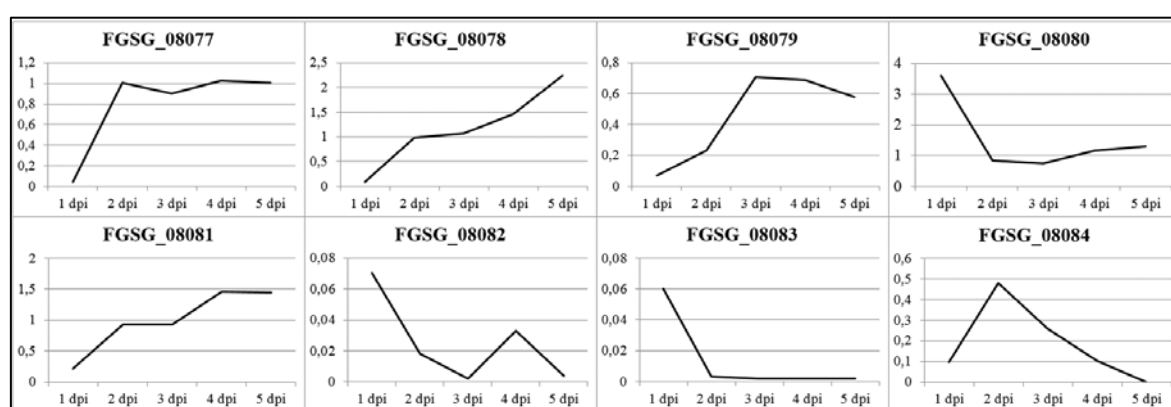


Abb. 12: Graphische Darstellung der Bandenintensitäten der Butenolid-Clustergene im Vergleich zu β -Tubulin im Zeitverlauf.

Bei Betrachtung der Ergebnisse aus Tabelle 12 fällt auf, dass der Cluster-interne Transkriptionsfaktor, FGSG_08080 nach 1 dpi im Vergleich zu β -Tubulin die 3-fache Intensität aufweist. Im weiteren Verlauf nimmt die Transkriptmenge zunächst ab um dann ab 4 dpi wieder anzusteigen. Für das Gen FGSG_08077 wurden nur geringe Unterschiede im Zeitverlauf von 1 bis 5 dpi beobachtet. Anders verhält es sich für FGSG_08078 und FGSG_08081. Hier nimmt die Bandenintensität im Vergleich zu β -Tubulin für FGSG_08078 von 1 bis 5 dpi, für FGSG_08081 von 1 bis 4 dpi kontinuierlich zu. Die Transkriptmenge für FGSG_08079 ist zum Zeitpunkt 2 dpi noch gering, steigt jedoch bei 3 dpi an und verringert sich nur leicht nach 4 dpi, ehe sie sich ab 5 dpi wieder deutlicher verringert.

Wie zuvor in Abbildung 11 beobachtet, konnten schwache Banden für FGSG_08082 nur zu den Zeitpunkten 2 und 4 dpi nachgewiesen werden. Dies äußert sich in Tabelle 12 in niedrigen Intensitätswerten im Vergleich zum Referenzgen. Die Transkriptmenge für FGSG_08084 nimmt ab 2 dpi im weiteren Verlauf ab, bis bei 5 dpi keine Bande mehr nachgewiesen werden konnte.

Zum Zeitpunkt 2 dpi konnte sowohl Butenolid via LC-MS/MS, als auch die Expression von sieben der acht Clustergene nachgewiesen werden. Da nach 1 dpi weder Butenolid, noch mehrere Clustergene nachgewiesen werden konnten, konnte der Zeitpunkt für die Butenolidsynthese zwischen 1 und 2 dpi eingegrenzt werden. Des Weiteren ändern sich die Expressionsstärken der Clustergene im Zeitverlauf.

3.2.4 Erstellung und Nachweis von Deletions- und Komplementationsmutanten des Gens FGSG_08079

Mit dem vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Butenolid-Synthese in den ersten 2 Tagen nach der Inokulation mit dem 8/1_DsRed Stamm induziert wurde. Es ist daher denkbar, dass Butenolid eine Rolle in der frühen Infektionsphase einnimmt. Um dies zu überprüfen wurden Deletionsmutanten des Gens FGSG_08079, einer Cytochrom P450 Monooxygenase, erstellt, um die Butenolid-Synthese zu unterbinden. Mit Hilfe der FGSG-Nummer konnte dessen Gensequenz zusammen mit angrenzenden Genen von der Datenbank „MIPS-*Fusarium graminearum* Database Pedant“ ermittelt werden.

Für die Erstellung des Deletionsplasmids wurde die Hefe-Rekombinationsklonierung verwendet. Hierfür mussten zunächst Bereiche auf beiden Seiten des Gens FGSG_08079 per PCR amplifiziert werden. Die verwendeten Primer besaßen Überhänge sowohl zu dem Vektor pRS426, als auch zur Nourseothricin-Resistenzkassette (2.1.3, Tab. 2), welche mittels Restriktion aus einem weiteren Vektor (pNRI) isoliert wurde. Durch die homologen Bereiche konnten die Fragmente in einem Uracil-auxotrophen Hefestamm (FY834) über homologe Rekombination zu einem vollständigen Plasmid zusammengesetzt werden. Prototroph transformierte Hefezellen konnten selektiert werden, da der pRS426 Vektor das Gen für die Uracil Biosynthese beinhaltet.

Die homologe Integration in den Genloкус von FGSG_08079 fand mittels doppeltem Crossing-over statt. Die homologen Bereiche auf beiden Seiten des Gens ermöglichen dessen Austausch durch das Fusionskonstrukt (Abb. 13, gestrichelte Linien). Die eingebrachte Nourseothricin-Kassette (Nat^R, Abb. 13-A) diente der Selektion von Primärtransformanten. Die erhaltenen Transformanten wurden via PCR mit Gen-

spezifischen Primern (Abb. 13-A, schwarze Pfeile) auf die FGSG_08079 Deletion hin untersucht (2.1.3, Tab. 2). Die homologe Integration des Konstruktes *in locus* soll zur Deletion des Gens führen. Folgerichtig kann mit den gewählten, genintern-bindenden Primern kein PCR-Produkt amplifiziert werden (Abb. 13-B). Auf diese Weise identifizierte Deletionsmutanten wurden einer Southern Blot Analyse unterzogen um die Deletion und die Anzahl eventuell vorhandener ektopischer Vektorintegrationen zu verifizieren. Dafür wurde die mit *EcoRV*-restringierte genomische DNA der Mutanten und des 8/1_DsRed Stammes elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der Integration des Konstruktes kam eine PCR-Sonde zum Einsatz, die auf dem Fragment der rechten Flanke (RF) band (Abb. 13-A). Aufgrund des Schnittmusters von *EcoRV* wurde für den 8/1_DsRed eine Bande von 1783 bp erwartet und auch nachgewiesen (Abb. 13-B). Die Δ But Mutanten 1+3 wiesen die erwartete Bande bei ca. 4008 bp auf. Für die Mutante Δ But-2 konnten zwei Fragmente detektiert werden.

Aus diesem Grund wurde die Nylonmembran nach dem Entfernen der RF-Sonde mit einer zweiten Sonde für die Resistenzkassette hybridisiert. Δ But-1+3 wiesen wieder eine Bande bei 4008 bp auf. Für die Mutante Δ But-2 konnte nur das größere Fragment nachgewiesen werden (Abb. 13-D). Sie wurde trotzdem für weitere Analysen verwendet.

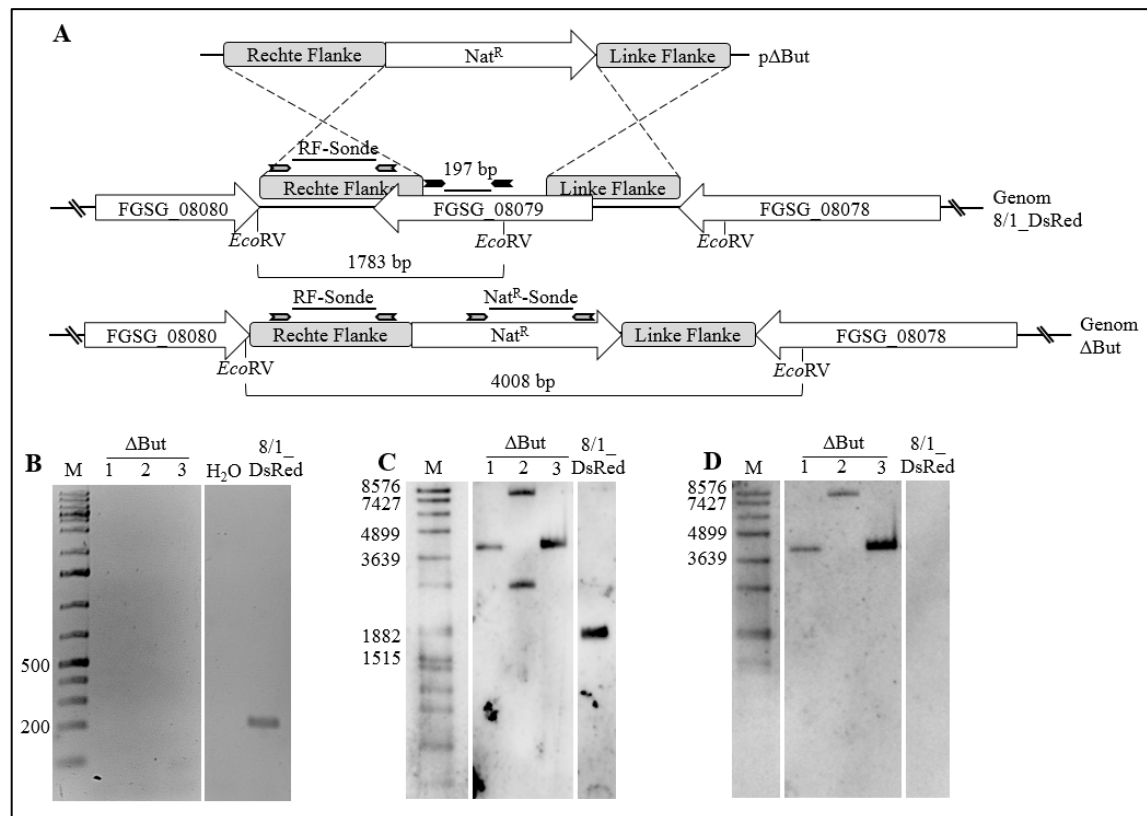


Abb. 13: Generierung von Deletionsmutanten des Gens FGSG_08079 mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen Deletion. **A** Schematische Darstellung der homologen Rekombination im Genlokus von FGSG_08079. Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte in den Vektor pRS426 (Christianson et al., 1992) mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Es erfolgte eine homologe Integration des Deletionskonstruktes in das *F. graminearum*-Genom 8/1_DsRed durch ein doppeltes Crossing-over. Die Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat^R) diente zur Selektion der Transformanten. **B** PCR-Nachweis der homologen Rekombination des Deletionskonstruktes in den nativen FGSG_08079-Lokus in erhaltenen Transformanten. Dazu wurden die Primer AGL_qRT08079_fwN und AGL_qRT08079_rvN (siehe A: schwarze Pfeilspitzen, Primersequenzen in 2.1.3, Tab. 2) generiert. Die Abwesenheit des PCR-Fragmentes in den ΔBut-1-3 Mutanten (ΔBut: 0 bp, 8/1_DsRed: 197 bp) beweisen die Integration des Deletionskonstruktes in den nativen Genlokus. **C** + **D** Southern Blot Analyse von Transformanten, die in der PCR eine Deletion des FGSG_08079 Gens zeigten. Hierfür wurde die mit *EcoRV*-restringierte genomische DNA von 8/1_DsRed und der ΔBut Mutanten 1-3 mit einer Sonde für die rechte Flanke (RF-Sonde, siehe A) hybridisiert (C). In den ΔBut Mutanten 1 und 3 konnte eine Bande von 4008 bp detektiert werden. 8/1_DsRed weist ein Signal bei 1783 bp auf. Aufgrund einer Doppelbande für die Mutante ΔBut-2 wurde die RF-Sonde entfernt und die Membran mit einer Sonde für die Resistenzkassette hybridisiert (D). Die Mutanten ΔBut-1+3 zeigen weiterhin eine Bande bei 4008 bp, wohingegen ΔBut-2 nur noch eine einzelne Bande aufweist. Marker (M) B: Gene Ruler 1kb Plus (Thermo Scientific), Marker C+D: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG labeled (Roche).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden alle generierten Mutanten charakterisiert. Um zu zeigen, ob dabei auftretende Variationen zum Referenzstamm ursächlich durch die Deletion von FGSG_08079 hervorgerufen wurden, wurde in die Mutante ΔBut-3 (1585.6.5) das Gen reintegriert (Komplementation). Das verwendete Plasmid (pKΔBut) wurde ebenfalls mit Hilfe der Heferekombinationsklonierung erstellt. Es besaß als flankierende Bereiche zum einen den nativen Promotor mit anschließendem ORF des Gens, zum anderen die rechte Flanke, welche auch als homologer Bereich für die Deletion verwendet wurde. Zwischen diese beiden Fragmente wurde die Hygromycin-Resistenzkassette (HygB) eingesetzt. Für

die *in locus* Integration des Konstruktes wurde dieses mit den Enzymen *XhoI* und *NotI* aus dem Plasmid isoliert und in *F. graminearum* Protoplasten transformiert. Nach Überprüfung der erhaltenen Transformanten konnte zwar das Gen, jedoch kein Transkript unter CM-Kulturbedingungen nachgewiesen werden, während der Referenzstamm Transkript zeigte. Aus diesem Grund wurde eine weitere Transformation durchgeführt, in der das Komplementationskonstrukt ektopisch in das Genom integriert werden sollte. Hierfür wurde das Plasmid mit *AhdI* linearisiert. Nachdem via PCR die Gensequenz mit gen-spezifischen Primern nachgewiesen wurde (Abb. 14-B), wurde diese ebenfalls auf Transkriptionsebene überprüft (Abb. 14-C). Es konnten Transkripte unter Kulturbedingungen nachgewiesen werden.

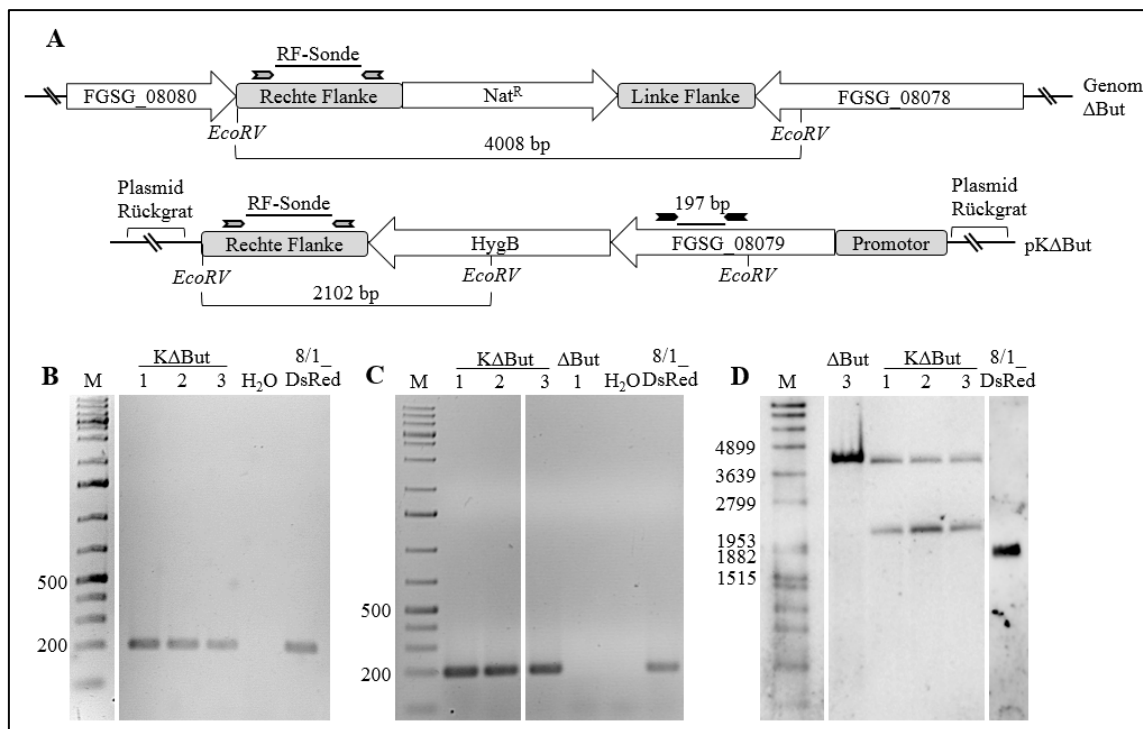


Abbildung 14: Generierung von Komplementationsmutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Integrationsnachweis. A Schematische Darstellung des Genoms der für die Komplementation verwendeten Δ But-Mutante (oben) und des pK Δ But Plasmids. Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte in den Vektor pRS426 (Christianson et al., 1992) mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung (2.2.4.1). Die Integration des durch *AhdI* linearisierten Plasmids pK Δ But erfolgte ektopisch in das Genom einer Δ But-Mutante. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*HygB*) diente zur Selektion von Transformanten. B PCR-Nachweis der Reintegration der FGSG_08079 Sequenz. Dazu wurden die Primer AGL_qRT08079_fwN und AGL_qRT08079_rvN (siehe A: schwarze Pfeilspitzen, Primersequenzen in 2.1.3, Tab. 2) verwendet. Sowohl in den drei getesteten Komplementationsmutanten, als auch im 8/1_DsRed konnte ein 197 bp Fragment amplifiziert werden. C Transkriptnachweis via PCR (cDNA als Template) für die reintegrierte FGSG_08079 Sequenz. Es wurden dieselben Primer wie für den genomischen PCR-Nachweis verwendet. Der Transkriptnachweis konnte ebenfalls für alle drei Komplementationsmutanten (K Δ But) und den 8/1_DsRed Stamm, nicht jedoch für die Deletionsmutante (Δ But-1) erbracht werden. D Southern Blot Analyse positiver Transformanten. Hierfür wurde die mit *EcoRV*-restringierte genomische DNA von 8/1_DsRed, Δ But-3 und der K Δ But Mutanten 1-3 mit einer Sonde für die rechte Flanke (RF-Sonde, siehe A) hybridisiert. In den K Δ But Mutanten 1-3 konnten zwei Banden detektiert werden. Die Integration des Komplementationsplasmids in das Genom erfolgte dementsprechend zufällig. Dadurch konnte sowohl die ursprüngliche Deletion (4008 bp) als auch die Integration des Plasmids (2102 bp) nachgewiesen werden. Der 8/1_DsRed Stamm weist ein Signal bei 1783 bp auf. Marker (M) B+C: Gene Ruler 1kb Plus (Thermo Scientific), Marker D: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG labeled (Roche).

Die Integration des Konstruktes und der Δ But-Hintergrund der Mutanten wurden ebenfalls über einen Southern Blot mittels *EcoRV* restringierter gDNA bestätigt. Die Komplementationsmutanten wiesen das erwartete Fragment der Δ But-Mutante bei 4008 bp und das des Konstruktes bei 2102 bp auf (Abb. 14-D).

Die generierten Deletions- und Komplementationsmutanten wurden nun auf ihre Fähigkeit, während der Weizeninfektion Butenolid zu synthetisieren, getestet. Hierfür wurde die Δ But-3 Mutante und die aus dieser Mutante abgeleiteten, unabhängigen Komplementationsmutanten mittels LC-MS/MS analysiert. Hierfür wurden ca. 100 mg mit dem jeweiligen Stamm infiziertes Pflanzenmaterial, geerntet 5 Tage nach der Inokulation, verwendet. Des Weiteren wurde gDNA aus ca. 20 mg desselben Materials isoliert. Mittels qRT-PCR und pilz-spezifischen β -Tubulin Primern konnte die Konzentration an Pilz gDNA anhand erhaltener Ct-Werte und mittels einer Standardkurve für reine Pilz gDNA bestimmt werden. Die gemessenen Konzentrationen an Butenolid wurden anschließend auf die bestimmte Menge an Pilz normalisiert. Die Ergebnisse der Butenolid-Bestimmung sind in der Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf die gemessene Menge pilzlicher gDNA. Weizenpflanzen wurden entweder mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante oder der K Δ But-1-3 Mutanten an 2 Blüten punktinokuliert und nach 5 Tagen geerntet. Aus ca. 20 mg gemörsertem Material wurde die gDNA isoliert und mittels qRT-PCR die enthaltene Menge an Pilz gDNA bestimmt. 100 mg Material wurden für eine LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid verwendet (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht. Pro biologischem Replikat wurden die Blüten zweier inokulierter Ähren inklusive angrenzender Bereiche verwendet.

Stamm	Replikatnr.	Butenolid [mg/kg]
8/1_DsRed	1	35,50
	2	33,04
	3	48,41
Δ But-3	1	0,00
	2	0,00
	3	0,00
K Δ But-1	1	2,65
	2	44,13
	3	16,26
K Δ But-2	1	34,99
	2	28,34
	3	15,15
K Δ But-3	1	36,86
	2	29,24
	3	36,37

Mittels der LC-MS/MS konnte sowohl für den Referenzstamm 8/1_DsRed, als auch für alle drei Komplementationsmutanten Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial nachgewiesen

werden. Die gemessenen Konzentrationen innerhalb der biologischen Replikate variieren zwischen den verschiedenen Mutanten. Für die Mutante K Δ But-1 wurde mit 2,65 mg/kg (1. Replikat) eine sehr geringe Menge Butenolid bestimmt. Auch das dritte biologische Replikat dieser Mutante weist einen niedrigen Butenolid-Wert auf (16,26 mg/kg). Gleiches kann für das dritte biologische Replikat der K Δ But-2 Mutante beobachtet werden. Der komplementierte Stamm K Δ But-3 zeigt im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm ähnliche Butenolid Konzentrationen.

Zusammengefasst war durch die Reintegration der FGSG_08079 Gensequenz die Butenolid-Synthese wieder ermöglicht worden.

3.2.5 Die Komplementation von FGSG_08079 führt zu einer veränderten Expression der Butenolid-Clustergene während der Weizeninfektion

Die LC-MS/MS Analysen infizierter Weizenproben haben gezeigt, dass die Komplementation der Δ But-Mutante, durch die Reintegration der FGSG_08079 Sequenz, die Butenolid-Synthese wiederhergestellt hat. Die ermittelten Konzentrationen an hergestelltem Butenolid schwanken jedoch innerhalb der K Δ But-Mutanten deutlich und sind teilweise im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed verringert. Aus diesem Grund wurde überprüft, welchen Einfluss die ektopische Reintegration der FGSG_08079 Sequenz in das Genom auf dessen Expressionsstärke und der der anderen Gene des Genclusters hat. Hierfür wurde RNA aus dem für die LC-MS/MS Analyse verwendeten Material isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer qRT-PCR wurde die Expression aller Clustergene in den Komplementationsmutanten und im 8/1_DsRed Stamm bestimmt, auf die β -Tubulin Expression normalisiert und Expressionsunterschiede berechnet. Die Expression für den 8/1_DsRed Stamm wurde hierbei auf 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 15 dargestellt.

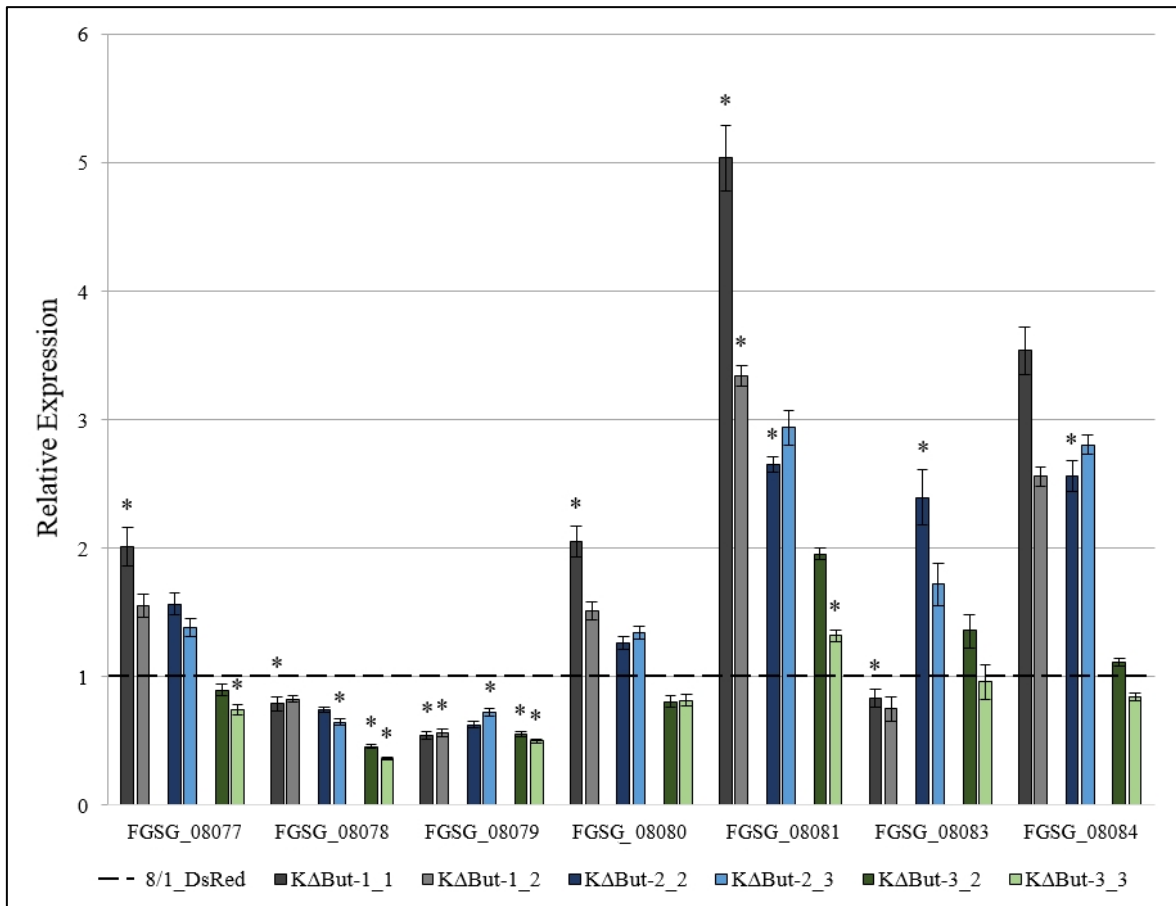


Abb. 15: Expressionsanalyse der Gene des Butenolid-Clusters während der Weizeninfektion von KΔBut-Mutanten und des 8/1_DsRed Stammes (5 dpi). Für die Expressionsanalyse der acht Gene des Butenolid-Clusters wurde zunächst RNA von 2 biologischen Replikaten der KΔBut- Mutanten 1-3 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde für eine qRT-PCR mit Pilz-spezifischen Primern für β -Tubulin und für die Clustergene durchgeführt. Die Expressionsstärke analysierter Gene innerhalb der Mutanten im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed wurde mit dem Programm REST-348 (Relative Expression Software Tool; Pfaffl et al. 2002) bestimmt. Die Expression des Referenzstammes wurde auf 1 gesetzt. Pro Mutante wurden 2 biologische Replikate verwendet, die in der qRT-PCR Analyse jeweils mit 3 technischen Replikaten/Genexpression analysiert wurden. Ein Stern stellt eine signifikante Veränderung nach dem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl et al. 2002, $p < 0,05$) dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler wieder. KΔBut-X gibt die jeweilige Komplementationsmutante an (1-3). Der Nachsatz _X steht hierbei für das verwendete biologische Replikat (1-3). Das verwendete Material ist identisch mit dem für die LC-MS/MS Analyse verwendeten Material (3.2.4).

Die Expressionsanalyse hat ergeben, dass sich in keinem der analysierten Stämme das Transkript des Gens FGSG_08082 nachweisen lies. Die Funktionalität der Primer wurde mittels gDNA überprüft. Hier konnte ein Produkt richtiger Größe amplifiziert werden (s. Anhang 8.1, Abb. 49). Da die Primer außerhalb eines Introns binden, sollte sowohl mit gDNA, als auch mit cDNA als Template ein Produkt amplifiziert werden können.

Wie sich der Abbildung 15 entnehmen lässt ist die Expression einzelner Gene des Clusters innerhalb der biologischen Replikate im Vergleich zum 8/1_DsRed signifikant verändert. Gemeinsam haben fast alle analysierten Mutanten die signifikante Expressionsverringerng des komplementierten FGSG_08079 Gens. Betrachtet man sich die Expressionen aller anderen Gene so fällt auf, dass sich trotz fehlender Signifikanzen Tendenzen für eine Hoch-

oder Runterregulation zeigen. So ist die FGSG_08077 Expression zwar nur für die Mutante KΔBut-1_1 signifikant erhöht, für das zweite biologische Replikat der KΔBut-1 und beider KΔBut-2 Replikate höher als für den 8/1_DsRed Stamm (= 1). Lediglich KΔBut-3 zeigt eine (teilweise signifikante) Verringerung. Ähnlich verhält es sich mit der Expression von FGSG_08080. FGSG_08078 zeigt ausschließlich für die Mutanten KΔBut-1_2 (2. biologisches Replikat KΔBut-1 Mutante) und KΔBut-2_2 (2. biologisches Replikat KΔBut-2 Mutante) keine signifikante Veränderung. Alle anderen untersuchten Mutanten sind in Bezug auf dieses Gen signifikant zum 8/1_DsRed verringert. FGSG_08081 weist in fast allen Komplementationsmutanten eine signifikant höhere Expression als der Referenzstamm 8/1_DsRed auf. Hier sind die Expressionen der Mutanten KΔBut-2_3 und KΔBut-3_2 zwar größer als 1, jedoch ohne Signifikanz. Für FGSG_08083 konnte sowohl eine signifikante Runter- (KΔBut-1_1) als auch eine signifikante Hochregulation (KΔBut-2_2) detektiert werden. Weitere untersuchte Mutanten wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Das letzte Gen, FGSG_08084 ist nur in der Mutante KΔBut-2_2 signifikant in der Expression erhöht. Bis auf die biologischen Replikate der KΔBut-3 Mutante weisen die anderen untersuchten Mutanten eine 2 bis 3,5-fache Expression im Vergleich zum 8/1_DsRed auf.

Die ektopische Reintegration von FGSG_08079 führt demnach zu einem veränderten Expressionsprofil der Butenolid-Clustergene im Vergleich zum Referenzstamm. Die Expression des Gens selbst ist ebenfalls verändert.

3.2.6 Das Fehlen von Butenolid führt zu einer erhöhten Virulenz von *F. graminearum* während der frühen Infektionsphase auf Weizen

Nachdem drei unabhängige Mutanten sowohl mittels PCR- als auch Southern Blot- Analyse als Deletionsmutanten bestätigt wurden, wurden diese hinsichtlich ihres Infektionsverhaltens analysiert. Hierfür wurde zunächst das Schadbild punktinokulierter Ähren des susceptible Weizenkultivars „Nandu“ nach 21 Tagen ausgewertet.

Des Weiteren wurden die KΔBut Mutanten der gleichen Analyse unterzogen um zu überprüfen, ob sich die Reintegration der FGSG_08079 Gensequenz bzw. die zuvor gezeigte teilweise Deregulation des Genclusters auf die Infektion im Vergleich zum 8/1_DsRed auswirkt. Das Ergebnis des Pathogenitätstests ist in Abbildung 16 dargestellt.

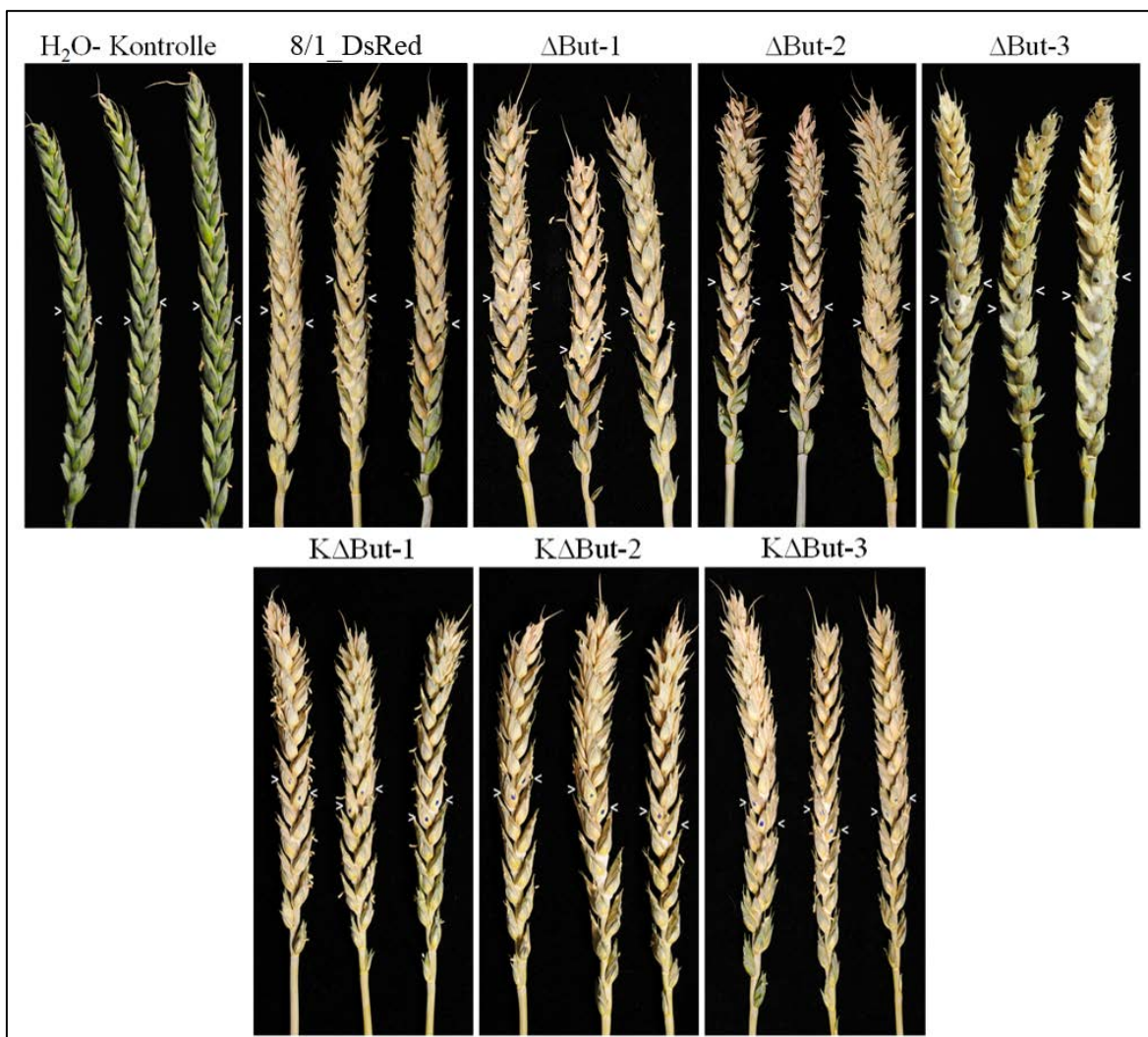


Abb. 16: Überprüfung der Pathogenität generierter Δ But- und $K\Delta$ But- Mutanten auf Weizen des Kultivars „Nandu“. Schadbilder von Weizenähren nach erfolgter Infektion mit *F. graminearum* Δ But- und $K\Delta$ But- Mutanten und dem 8/1_DsRed Stamm, 21 dpi. Weizenblüten wurden im Entwicklungsstand der Anthesis mit 200 Konidien des zu untersuchenden Stammes an zwei Blüten punktinokuliert (weiße Pfeilspitze). Der Referenzstamm 8/1_DsRed diente als Positivkontrolle (vollständige Infektion der Weizenähre) und eine Inokulation mit sterilem Wasser als Negativkontrolle (FHB-Symptom freie Ähre). Nach 21 Tagen zeigten sowohl die Ähren, die mit dem 8/1_DsRed -inokuliert wurden, als auch die mit den Δ But- und $K\Delta$ But- Mutanten inokulierten Ähren die typischen Symptome der Ährenbleiche. Pro untersuchtem Pilzstamm wurden 10 Ähren inokuliert.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, können sowohl die Δ But Mutanten, als auch die Komplementationsmutanten ($K\Delta$ But) die gesamte Weizenähre infizieren, was sich in dem typischen Ausbleichen der Ähre widerspiegelt. Die Deregulation des Clusters hat keine Auswirkung auf das Infektionsverhalten der $K\Delta$ But Mutanten.

Für die weitere Charakterisierung des Infektionsverhaltens Butenolid-defizienter Mutanten wurde die frühe Phase der Infektion näher betrachtet. Nach der Inokulation von einer Weizenblüte pro Ähre mit Konidien der Δ But und $K\Delta$ But Mutanten sowie des Referenzstammes 8/1_DsRed wurden diese nach 5 Tagen geerntet und einer eingehenden histologischen Untersuchung unterzogen. Hierfür wurde ein Längsschnitt durch die Ähren

durchgeführt. Da alle Transformanten im 8/1_DsRed Stamm erstellt wurden, konnte durch das integrierte rot fluoreszierende Protein DsRed der Infektionsverlauf des Pilzes innerhalb der Pflanze mit einer Stereolupe visualisiert werden. Es wurden serielle Bildaufnahmen des infizierten Bereiches der Ähre aufgenommen und zusammengefügt. Die histologische Untersuchung hat ergeben, dass alle drei Δ But Mutanten die Pflanze nach 5 Tagen schneller kolonisiert hatten als der Referenzstamm 8/1_DsRed (Abb. 17-A, weißer Pfeil). Die Komplementationsmutanten hingegen infizierten die Blüte wie der 8/1_DsRed Stamm und konnten in dem Bereich vor dem Rachisknoten detektiert werden. Es konnte eine verringerte Fluoreszenzintensität für die K Δ But Mutanten im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm trotz gleicher Belichtungszeiten beobachtet werden (Abb. 17-A).

Zur Verifizierung der histologischen Ergebnisse wurde eine PCR-basierte Quantifizierung des Pilzmaterials in infizierten Weizenähren durchgeführt. Hierfür wurde das Material verwendet, welches ebenfalls für die Butenolid-Bestimmung in infiziertem Pflanzenmaterial verwendet wurde (s. 3.2). Als Primer wurden Pilz-spezifische β -Tubulin Primer verwendet. Anhand einer Standardkurve und der erhaltenen Ct-Werte konnte die Menge an Pilz-gDNA innerhalb der Pflanze bestimmt werden. Für den Vergleich zwischen Mutanten und Referenzstamm wurde das Verhältnis der Mutanten gDNA zur gDNA des 8/1_DsRed Stammes berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die molekulare Quantifizierung das Ergebnis der Histologie widerspiegelt (Abb. 17, B).

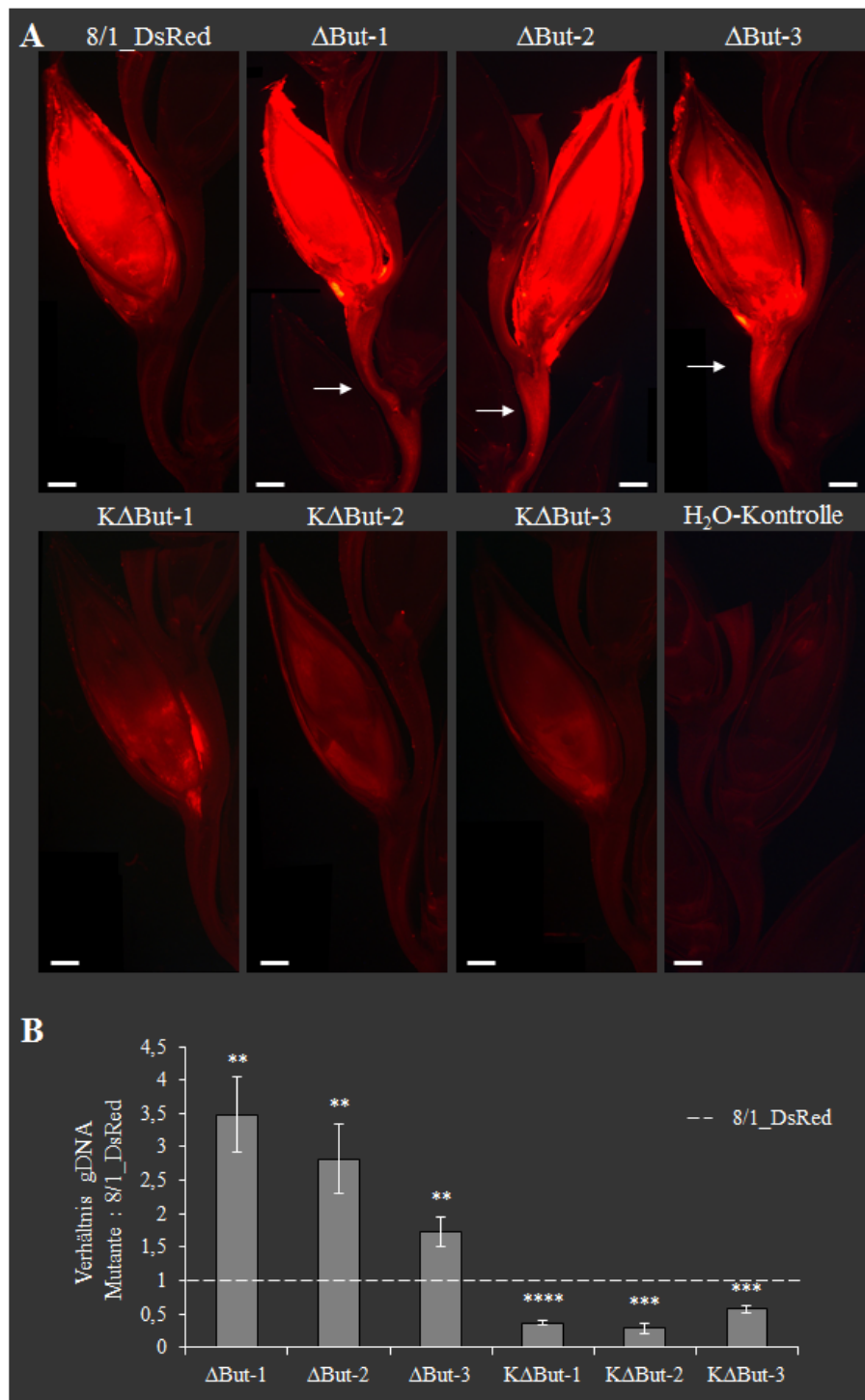


Abb. 17: Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B) von Deletions- und Komplementationsmutanten.

A Histologische Untersuchung von Weizenähren. Die Ernte von inokulierten Weizenblüten erfolgte 5 Tage nach der Inokulation. Alle Pilzstämme exprimierten das rot fluoreszierende Protein DsRed konstitutiv und konnten somit innerhalb der Pflanze visualisiert werden. Längenmaßstab: 1 mm. Weiße Pfeile deuten auf die Ausbreitung der Pilzstämme. **B** Molekulare Quantifizierung von Pilz-gDNA. Aus infiziertem Pflanzenmaterial wurde gDNA isoliert und die Konzentration an pilzlicher gDNA mittels qRT-PCR bestimmt. Pro analysierter Mutante wurden 3 biologische Replikate untersucht. Für die Quantifizierung via qRT-PCR Analyse wurden jeweils 3 technische Replikate angefertigt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm) durchgeführt.

Für die Mutanten Δ But 1-3 konnte die 1,7- bis 2,6-fache Menge an gDNA im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis passt zu der beobachteten, schnelleren Kolonisierung der Weizenähre (Abb. 17-A). Für die Mutanten K Δ But 1-3 konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp der Deletionsmutanten durch die Integration der Gensequenz von FGSG_08079 in der Hinsicht komplementiert werden konnte, dass sie ein verringertes Wachstum während der Infektion zeigen als die dazugehörige Deletionsmutante. Allerdings war das Wachstum auch im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm signifikant verringert. Die während der histologischen Untersuchung beobachtete verringerte Fluoreszenz der K Δ But 1-3 Mutanten ist möglicherweise auf eben jenes reduzierte Wachstum zurückzuführen.

Um ausschließen zu können, dass die Δ But- bzw. K Δ But- Mutanten generell ein erhöhtes bzw. verringertes Wachstum im Vergleich zum 8/1_DsRed aufweisen wurde eine CM-Agarplatte mit 200 Konidien des jeweiligen Stammes inokuliert und für 3 Tage bei 28 °C inkubiert (Abb. 18).

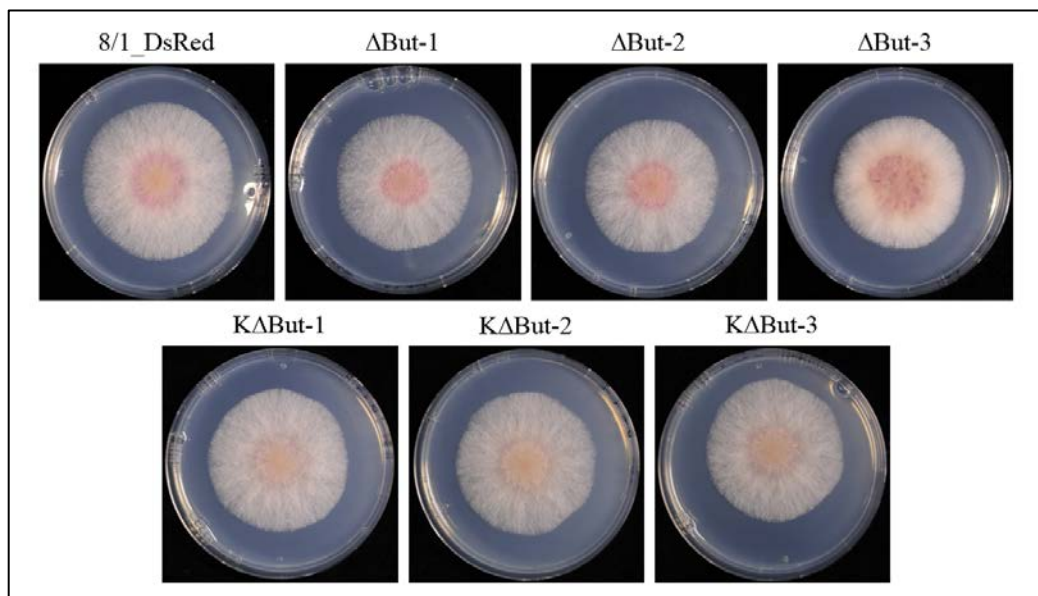


Abb. 18: Überprüfung des *in vitro* Wachstums auf CM-Agar. 200 Konidien des 8/1_DsRed Stammes und dreier Δ But- bzw. K Δ But- Mutanten wurden in das Zentrum einer CM-Agarplatte pipettiert und für 3 Tage bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Pro Stamm wurden drei technische Replikate angefertigt.

Wie die Abbildung 18 zeigt, wachsen sowohl die Deletions- als auch die Komplementationsmutanten auf CM-Agar wie der 8/1_DsRed Referenzstamm. Daher handelt es sich bei dem veränderten Wachstum der Mutanten in der Weizenblüte um einen infektionsspezifischen, butenolidbezogenen Phänotypen und keinen generellen Fitnessdefekt der Mutanten gegenüber dem Referenzstamm.

3.2.7 Das Fehlen von Butenolid hat keinen Einfluss auf die Synthese des Mykotoxins Deoxynivalenol

Das Fehlen des Sekundärmetabolites Butenolid führt zu einer erhöhten Virulenz in der frühen Infektionsphase von *F. graminearum* auf Weizen (Abb. 17). Ein weiteres, für die Infektion von Weizen wichtiges, Sekundärmetabolit ist das Mykotoxin Deoxynivalenol. Die Deletion des ersten Enzyms des DON-Clusters, einer Trichodien Synthase (Tri5), führt zu einem kompletten Stop der Toxinsynthese (Proctor et al. 1995). Maier et al. (2006) konnten zeigen, dass DON ein essenzieller Virulenzfaktor für die Kolonisierung des Rachisknotens von Weizenblüten ist.

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Virulenz der Δ But Mutanten auf eine erhöhte, die verringerte Virulenz der $K\Delta$ But Mutanten auf eine verringerte, DON Synthese zurückzuführen sein könnte, wurde mittels LC-MS/MS Analyse die Konzentration an DON in infiziertem Pflanzenmaterial bestimmt. Hierfür wurde das gleiche Material verwendet wie für die Butenolid-Bestimmung (3.2). Für die Normalisierung auf Pilz gDNA wurden ebenfalls die bereits mit qRT-PCR ermittelten gDNA Konzentrationen aus Kapitel 3.2 verwendet. Die Ergebnisse der DON-Bestimmung sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tab. 14: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf die ermittelte gDNA Konzentration. Infizierte Weizenpflanzen wurden nach 5 Tagen geerntet und anschließend unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Aus ca. 20 mg Material wurde die gDNA isoliert und mittels qRT-PCR die enthaltene Menge an Pilz gDNA bestimmt. 100 mg Material wurden für eine LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid verwendet (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht. Das verwendete Material war identisch mit dem der Butenolid-Bestimmung (3.2). Des Weiteren wurden die ermittelte Konzentration an pilzlicher gDNA ebenfalls aus Kapitel 3.2 übernommen.

Stamm	Replikatnr.	DON [mg/kg]
8/1_DsRed	1	126,80
	2	164,21
	3	318,71
Δ But-3	1	137,67
	2	185,63
	3	257,67
$K\Delta$ But-1	1	276,33
	2	206,52
	3	208,24
$K\Delta$ But-2	1	359,59
	2	350,17
	3	302,94
$K\Delta$ But-3	1	328,96
	2	217,49
	3	175,35

Die Tabelle 14 zeigt, dass die Konzentrationen an synthetisiertem DON während der Weizeninfektion innerhalb der biologischen Replikate für alle getesteten Stämme starken Schwankungen unterliegen. So reichen die ermittelten DON Konzentrationen für den 8/1_DsRed von 126,80 mg/kg bis 328,71 mg/kg.

In ähnlichen Bereichen liegen die DON Konzentrationen für die Deletionsmutante Δ But-3 und für die Mutante K Δ But-3. Die Komplementationsmutante 1 (K Δ But-1) weist Konzentrationen zwischen 206,24 mg/kg und 276,33 mg/kg DON auf. Lediglich die Mutante K Δ But-3 weist insgesamt höhere Konzentrationen an synthetisiertem DON auf als der Referenzstamm.

Es konnten keine Unterschiede zwischen der Δ But-3 Mutante und dem 8/1_DsRed Stamm beobachtet werden. Dass die erhöhte Virulenz auf eine verstärkte Synthese von DON zurückzuführen ist kann damit ausgeschlossen werden. Die ermittelten DON Konzentrationen für die Komplementationsmutanten sind im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed nicht verringert. Das leicht reduzierte Wachstum dieser Mutanten während der Weizenblüteninfektion kann aus diesem Grunde ebenfalls nicht auf eine veränderte DON-synthese zurückgeführt werden.

3.2.8 Die DON-Synthese unter DON-induzierenden *in vitro* Bedingungen ist in den Deletionsmutanten erhöht

Die Δ But-3 und K Δ But Mutanten sind in der Lage, während der Infektion von Weizen DON zu synthetisieren. Hierbei konnten ähnliche DON-Konzentrationen wie im Referenzstamm für die Deletionsmutanten gemessen werden. Die Komplementationsmutanten hingegen wiesen teilweise höhere Konzentrationen auf.

Welche Faktoren die *in planta* Induktion von DON einleiten ist bisher nicht bekannt. Die Synthese von DON kann jedoch *in vitro* durch die Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Covarelli et al. 2004, Ilgen et al. 2009) oder $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Harris et al., 2006) zu einem Minimalmedium induziert werden. Mit dieser Methode wurden die Δ But und K Δ But Mutanten dahingehend überprüft, DON *in vitro* synthetisieren zu können.

Der Anzucht der Stämme in Kompletmedium folgte die Ernte des Myzels und die Inokulation von 50 ml modifiziertes „MYRO“ Medium mit 1 g Myzel. Die Induktion erfolgte mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Zu den Zeitpunkten 3, 4 und 6 dpi wurden jeweils 2 ml Medium/Myzel Gemisch abgenommen, das Myzel abzentrifugiert und der Überstand via LC-MS/MS bzgl. DON analysiert. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 15: Bestimmung von DON via LC-MS/MS unter *in vitro* Induktionsbedingungen. Nach einer 3-tägigen Anzucht in CM folgte die Überführung von 1 g Myzel in 50 ml „MYRO“ Medium versetzt mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zur Induktion der DON Synthese. Nach 3, 4 und 6 dpi wurden 2 ml Medium/Myzel Gemisch abgenommen, zentrifugiert und die Konzentration an DON im Überstand mittels LC-MS/MS bestimmt (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Neben den dargestellten Einzelwerten (EW) wurden Mittelwerte (MW) aus 2 Replikaten gebildet. Fett geschriebene Messwerte wurden für die Berechnung nicht verwendet. Pro Stamm wurden 3 biologische Replikate analysiert.

DON [mg/kg]									
		8/1_DsRed		Δ But-1		Δ But-2		Δ But-3	
	Replikat nr.	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
3 dpi	1	39,65		0,68		107,7		121,5	
	2	82,67	91,2	156,2	134,6	239,3	81,9	73,53	97,5
	3	99,68		113,0		56,2		0,66	
4 dpi	1	48,49		308,9		222,0		210,4	
	2	118,0	143,9	303,8	306,4	447,1	334,6	82,59	215,4
	3	169,9		258,8		29,28		220,4	
6 dpi	1	97,59		512,9		333,7		418,3	
	2	192,3	214,8	471,1	462,9	706,1	209	10,43	396,2
	3	237,2		454,7		84,34		374,1	

DON [mg/kg]									
		K Δ But-1		K Δ But-2		K Δ But-3		Δ Tri5_GFP	
	Replikat nr.	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
3 dpi	1	81,54		41,36		26,24		0,00	
	2	209,2	55,5	41,46	41,41	17,03	21,6	0,94	0,00
	3	29,53		42,94		78,66		0,00	
4 dpi	1	138,7		101,3		85,17		0,00	
	2	0,00	268,2	84,42	80,8	58,73	71,9	0,87	0,44
	3	397,7		77,23		166,5		1,95	
6 dpi	1	226,8		230,9		234,5		1,75	
	2	606,6	146,8	226,9	228,9	171,3	202,9	1,29	1,97
	3	66,79		148,4		328,2		2,19	

Zunächst wurden die gemessenen Konzentrationen generell betrachtet. Da für die Probennahme nach 3, 4 und 6 Tagen stets dasselbe Replikat eines Stammes verwendet wurde, kann von einer stetigen Zunahme an DON ausgegangen werden. Dieser Zustand konnte auch bei den meisten Stämmen beobachtet werden. Einzig für Δ But-2, Δ But-3 und K Δ But-1 kommt es zu Verringerungen in der DON Konzentration: Das Replikat 3 der Δ But-2 Mutante weist nach 3 dpi eine DON Konzentration von 56,29 mg/kg auf. Nach 4 Tagen sinkt diese auf 29,28 mg/kg ab ehe nach 6 dpi wieder eine höhere Konzentration gemessen werden konnte (94,34 mg/kg).

Δ But-3_2 zeigt nach 3 dpi eine DON Konzentration von 73,53 mg/kg an, steigt nach 4 dpi bis auf 82,59 mg/kg und sinkt dann auf 10,43 mg/kg ab. Für das zweite Replikat der K Δ But-1 Mutante konnte sogar nach 4 dpi kein DON nachgewiesen werden, obwohl dies zum Zeitpunkt 3 dpi möglich war (209,2 mg/kg).

Diese gemessenen Veränderungen in der DON-Konzentration könnten darauf hindeuten, dass die Messung der Überstände nicht optimal für diese Proben lief. Es konnten sehr geringe Mengen an DON für die Δ Tri5_GFP Mutante ermittelt werden, obwohl diese nicht mehr in der Lage ist, DON zu produzieren.

Es können des Weiteren deutliche Unterschiede zwischen den Deletionsmutanten und dem 8/1_DsRed Stamm beobachtet werden. Aufgrund der teilweise großen Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten wurden Mittelwerte aus den zwei ähnlichsten Einzelwerten eines Zeitpunktes pro Stamm gebildet und für einen Vergleich verwendet (s. Tab. 15, MW). Nach 4 und 6 dpi produzierten die Δ But Mutanten mehr DON als der Referenzstamm und die Komplementationsmutanten. Während für den 8/1_DsRed Stamm nach 4 dpi 143,9 mg/kg DON nachgewiesen wurde, reichen die Konzentrationen für alle getesteten Δ But Mutanten im Mittel von 215,4 mg/kg bis 334,6 mg/kg. Die K Δ But Mutanten produzierten hingegen DON Konzentrationen die im Vergleich zum Wildtyp entweder erhöht (K Δ But-1= 268,2 mg/kg) oder verringert waren (K Δ But-2= 80,8 mg/kg; K Δ But-3= 71,9 mg/kg DON).

Bei Betrachtung der DON-Konzentrationen nach 6 dpi zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Der Referenzstamm weist im Mittel Konzentrationen von 214,8 mg/kg an DON auf. Im Vergleich dazu wurden für die Butenolid-defizienten Mutanten DON Konzentrationen zwischen 209 mg/kg und 462,9 mg/kg DON gemessen. Bis auf Δ But-2 (209 mg/kg) produzierten die Mutanten mehr DON als der 8/1_DsRed. Die Komplementationsmutanten produzieren hingegen im Mittel DON im Bereich von 146,8 mg/kg bis 228,9 mg/kg.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Δ But Mutanten mehr DON unter *in vitro* Bedingungen produzieren als der Referenzstamm und während der Infektion (s. 3.2.7). Die Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ als Induktionsmittel führt ebenfalls zur Induktion der Butenolid-Synthese (Harris et al, 2006). Die erhöhte Synthese von DON in Butenolid-defizienten Mutanten könnte somit auf das Fehlen von Butenolid zurückgeführt werden. Für diese Hypothese spricht ebenfalls, dass K Δ But Mutanten wieder in der Lage sind, Butenolid zu synthetisieren und deshalb niedrigere DON Konzentrationen aufweisen. Um dies zu überprüfen wurden die Überstände ebenfalls auf das Vorhandensein von Butenolid untersucht (Tab. 16).

Tab. 16: Bestimmung von Butenolid via LC-MS/MS unter *in vitro* Induktionsbedingungen. Nach einer 3-tägigen Anzucht in CM folgte die Überführung von 1 g Myzel in 50 ml „MYRO“ Medium versetzt mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zur Induktion der Butenolid Synthese. Nach 3, 4 und 6 dpi wurden 2 ml Medium/Myzel Gemisch abgenommen, zentrifugiert und die Konzentration an Butenolid im Überstand mittels LC-MS/MS bestimmt (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Neben den dargestellten Einzelwerten (EW) wurden Mittelwerte (MW) aus 2 Replikaten gebildet. Fett geschriebene Messwerte wurden für die Berechnung nicht verwendet. Pro analysiertem Stamm wurden 3 biologische Replikate analysiert.

Butenolid [mg/kg]									
		8/1_DsRed		$\Delta\text{But-1}$		$\Delta\text{But-2}$		$\Delta\text{But-3}$	
	Replikat nr.	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
3 dpi	1	0,00		0,00		4,39		0,00	
	2	1,01	0,73	0,00	0,00	194,0	4,28	0,00	0,00
	3	0,45		0,00		4,16		0,33	
4 dpi	1	0,00		0,00		4,28		0,00	
	2	0,39	0,65	0,00	0,00	177,9	5,78	0,28	0,14
	3	0,91		0,00		7,28		0,71	
6 dpi	1	0,00		0,00		1,20		1,28	
	2	1,09	1,83	0,00	0,00	76,5	2,01	1,84	1,18
	3	2,56		0,59		2,82		1,08	

Butenolid [mg/kg]									
		K $\Delta\text{But-1}$		K $\Delta\text{But-2}$		K $\Delta\text{But-3}$		$\Delta\text{Tri5_GFP}$	
	Replikat nr.	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
3 dpi	1	111,4		15,14		9,34		0,00	
	2	133,8	122,6	248,6	9,27	50,73	30	0,00	0,00
	3	15,51		3,40		240,3		0,00	
4 dpi	1	71,99		17,79		9,38		0,00	
	2	0,00	82,7	300,0	10,3	53,0	31,2	0,00	0,00
	3	93,40		2,83		222,0		0,00	
6 dpi	1	20,76		33,40		12,64		0,00	
	2	25,80	23,3	252,7	18,9	51,33	32	0,00	0,00
	3	2,26		4,45		261,6		0,45	

Was bei der Butenolid-Bestimmung zunächst auffällt sind die teilweise sehr hohen gemessenen Konzentrationen der Deletionsmutanten $\Delta\text{But-2}$ und $\Delta\text{But-3}$. Diese Messergebnisse deuten auf einen Fehler oder eine Verunreinigung innerhalb der Messungen hin, da zumindest für die $\Delta\text{But-3}$ Mutante während der Weizenblüteninfektion kein

Butenolid nachgewiesen wurde (3.2.4). Für die Δ But-1 Mutante wurde nur für ein Replikat nach 6 dpi eine geringe Butenolid-Konzentration nachgewiesen.

Die Reintegration der FGSG_08079 Gensequenz hatte die Butenolid-Synthese *in planta* wiederhergestellt. Auch unter induzierenden Kulturbedingungen sind die Komplementationsmutanten in der Lage, Butenolid zu synthetisieren. Für den Vergleich wurden wieder Mittelwerte aus den zwei ähnlichsten biologischen Replikaten gebildet. Die hierbei ermittelten Konzentrationen sind für die $K\Delta$ But Mutanten höher als die der Referenz. Die für den 8/1_DsRed gemessene Butenolid-Konzentration nach 3 dpi liegt bei 0,73 mg/kg. Die $K\Delta$ But Mutanten hingegen waren in der Lage zwischen 9,27 mg/kg und 122,6 mg/kg Butenolid zu synthetisieren. Diese deutlichen Unterschiede konnten auch nach 4 und 6 dpi beobachtet werden.

Allerdings schwanken die Butenolid-Konzentrationen innerhalb der Replikate und der Mutanten wesentlich stärker, als zuvor bei der DON Bestimmung. Es kommt ebenfalls häufiger zu Konzentrationsabnahmen bei späteren Zeitpunkten im Vergleich zu früheren. Da jedoch für die Δ But-2 und Δ But-3 Mutante Butenolid gemessen werden konnte, obwohl zumindest Δ But-3 nachgewiesenermaßen dazu nicht mehr in der Lage ist, müssen diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden.

Die Hypothese, dass die Synthese von Butenolid zu geringeren DON Werten, bzw. das Fehlen von Butenolid zu höheren DON Konzentrationen *in vitro* führt wird anhand der Δ But und $K\Delta$ But Mutanten bestätigt. Allerdings zeigt die Δ Tri5_GFP Mutante keine Synthese von Butenolid, wenn die DON Synthese ausbleibt.

3.2.9 Die nachträgliche Behandlung inokulierter Weizenblüten mit Butenolid führt zur chemischen Komplementation einer Δ But Mutante

Wie zuvor gezeigt, konnte durch die Reintegration der FGSG_08079 Sequenz die erhöhte Virulenz der Δ But Mutante komplementiert werden. Im nächsten Schritt galt es herauszufinden, ob der Virulenzphänotyp der Δ But Mutanten durch die externe Zugabe von synthetischem Butenolid ebenfalls komplementiert werden kann. Hierfür wurden 24 Std. nach der Punktinokulation von Weizenblüten mit der Δ But-3 Mutante bzw. dem 8/1_DsRed Stamm 10 μ l einer 100 ng/ml Butenolid Lösung in die bereits mit Konidien inokulierten Blüten gegeben und für weitere 4 Tage inkubiert. Als Kontrolle wurden mit sterilem Wasser nachbehandelte Ähren verwendet. Nach insgesamt 5 Tagen wurden die Ähren geerntet und eine molekulare Quantifizierung des infizierten Pflanzenmaterials via qRT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19-B aufgeführt. Zusätzlich zur Quantifizierung wurde eine histologische Untersuchung vorgenommen. Die Ähren wurden wie zuvor für die Quantifizierung beschrieben behandelt (s. 3.2.6, Abb. 17). Die einzige Änderung war die Inokulation von einer anstelle zweier Blüten pro Ähre (s. Abb. 19-A).

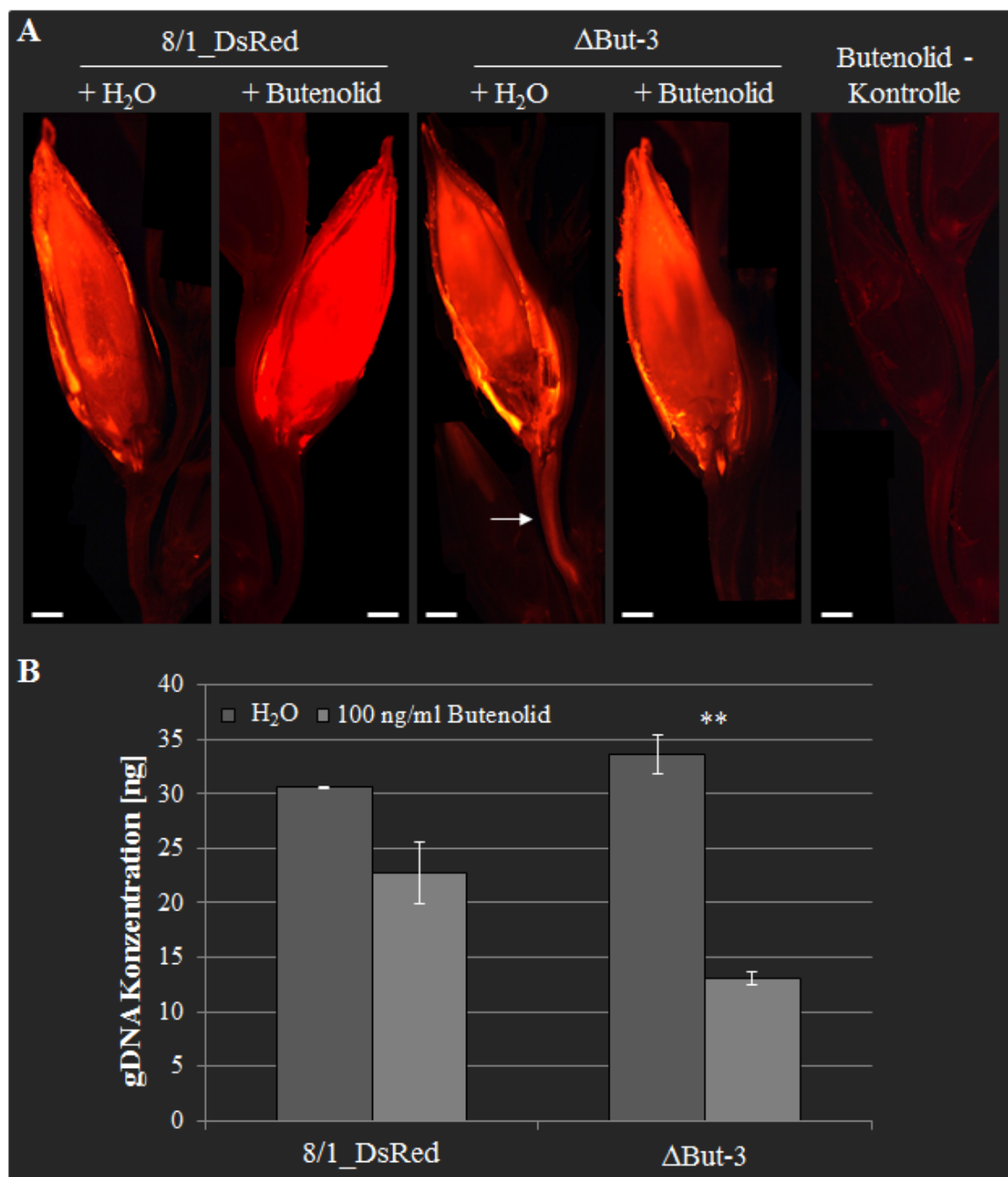


Abb. 19: Chemische Komplementation einer Δ But Mutante mit 100 ng/ml Butenolid. Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B). A Histologische Untersuchung von Weizenähren. 24 Std. nach der Inokulation einer Weizenblüte pro Weizenähre mit 200 Konidien des Stammes 8/1_DsRed bzw. der Δ But-3 Mutante wurden die Blüten mit 10 μ l einer 100 ng/ml Butenolidlösung bzw. H₂O behandelt. Die Ernte erfolgte 5 Tage nach der Inokulation mit Konidien. Das Pilzwachstum innerhalb der Weizenähre wurde durch die konstitutive Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRed visualisiert. Längenmaßstab: 1 mm. Der weiße Pfeil deutet auf die Ausbreitung der unbehandelten Δ But-3 Mutante. B Molekulare Quantifizierung von Pilz-gDNA. Die Behandlung und Ernte der Ähren erfolgte wie unter A beschrieben. Es wurden jedoch 2 Blüten mit den jeweiligen Konidien inokuliert und nachbehandelt. Aus dem Pflanze/Pilz-Material wurde gDNA isoliert und via qRT-PCR die Konzentration an pilzlicher gDNA berechnet. Das Experiment wurde mit 2 biologischen und jeweils 3 technischen Replikaten pro Bedingung (H₂O bzw. Butenolid) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet (**p* < 0,05, ***p* < 0,01).

Anhand der Abbildung 19 wird deutlich, dass die nachträgliche Zugabe von Butenolid einen signifikanten Einfluss auf die Infektion der Δ But-3 Mutante hat ($p < 0,01$, Student's t -Test). Die Reduktion des Wachstums vom 8/1_DsRed ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Kontroll- (H_2O) und der Butenolid-Behandlung. Die histologische Untersuchung zeigt das gleiche Ergebnis. Während der 8/1_DsRed bei der nachträglichen Inokulation sowohl mit Wasser, als auch mit Butenolid vor dem Rachisknoten der Weizenblüte zu erkennen ist, zeigt sich für die Mutante ein anderes Bild. Bei der Behandlung mit Wasser kann beobachtet werden, dass diese nach 5 Tagen die Weizenblüte über den Rachisknoten hinaus infizieren kann. Durch die Butenolid-Zugabe allerdings infiziert die Mutante nur bis zum Rachisknoten.

Die erhöhte Virulenz der Butenolid-defizienten Mutante konnte durch die externe, nachträgliche Zugabe dieses Metabolits komplementiert werden. Somit kann der Virulenzphänotyp der Δ But Mutanten auf das Fehlen von Butenolid zurückgeführt werden.

3.2.10 Erstellung und Nachweis von Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_08079

Neben der Erstellung von Butenolid-defizienten Mutanten wurden in dieser Arbeit ebenfalls Mutanten erstellt, die eine konstitutive Expression von FGSG_08079 aufwiesen. Hierfür wurde zunächst die gesamte Gensequenz mittels PCR amplifiziert. Für die konstitutive Expression des Gens wurde dieses an den konstitutiven *gpd* (Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase) Promotor aus *Aspergillus nidulans* (*gpdA*) fusioniert. Die Klonierung fand über Restriktionsschnittstellen statt. Ziel war es das Überexpressionskonstrukt in den Genlokus des nativen FGSG_08079 Gens via single-crossover so zu integrieren, dass nach der Transformation zwei intakte FGSG_08079 Gene vorlagen: Eins unter Kontrolle des nativen Promotors, das andere unter Kontrolle des konstitutiven *gpdA* Promotors. Hierfür wurde das Überexpressionsplasmid *pOE_But* mit dem Enzym *EcoRV* innerhalb der FGSG_08079 Sequenz linearisiert (vgl. Abb. 20) und in Protoplasten des *F. graminearum* Stammes 8/1_DsRed transformiert. Zunächst wurde die Integration des Plasmids bei den Sekundärtransformanten mittels Southern Blot überprüft. Bei korrekter homologer Integration, mit zwei intakten Gensequenzen, sollte nach Restriktion der gDNA mit dem Enzym *AhdI* und unter Verwendung einer Sonde, die in der rechten flankierenden Region (rechte Flanke) bindet, ein Fragment von 6500 bp für die Überexpressionsmutanten (OE_08079) entstehen. Für den 8/1_DsRed Stamm hingegen wurde ein Fragment von 3877 bp erwartet. Wie in Abbildung 20-B zu sehen ist, konnten eben jene Fragmente nachgewiesen werden. Als nächstes wurde überprüft, ob die Verwendung des konstitutiven *gpdA* Promotors tatsächlich zu einer erhöhten Expression des FGSG_08079 Gens führte. Hierfür wurde RNA von CM-Kulturen der OE_08079 Mutanten und des 8/1_DsRed Stammes isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR mit FGSG_08079 spezifischen Primern und Primern für das Haushaltsgen β -Tubulin wurde die Expression beider Gene sowohl für den Referenzstamm, als auch für die Mutanten bestimmt und normalisiert. Ein Vergleich der Expressionen wurde anhand erhaltener Ct-Werte durchgeführt. Das Ergebnis ist der Abbildung 20-C gezeigt und im Folgenden erläutert.

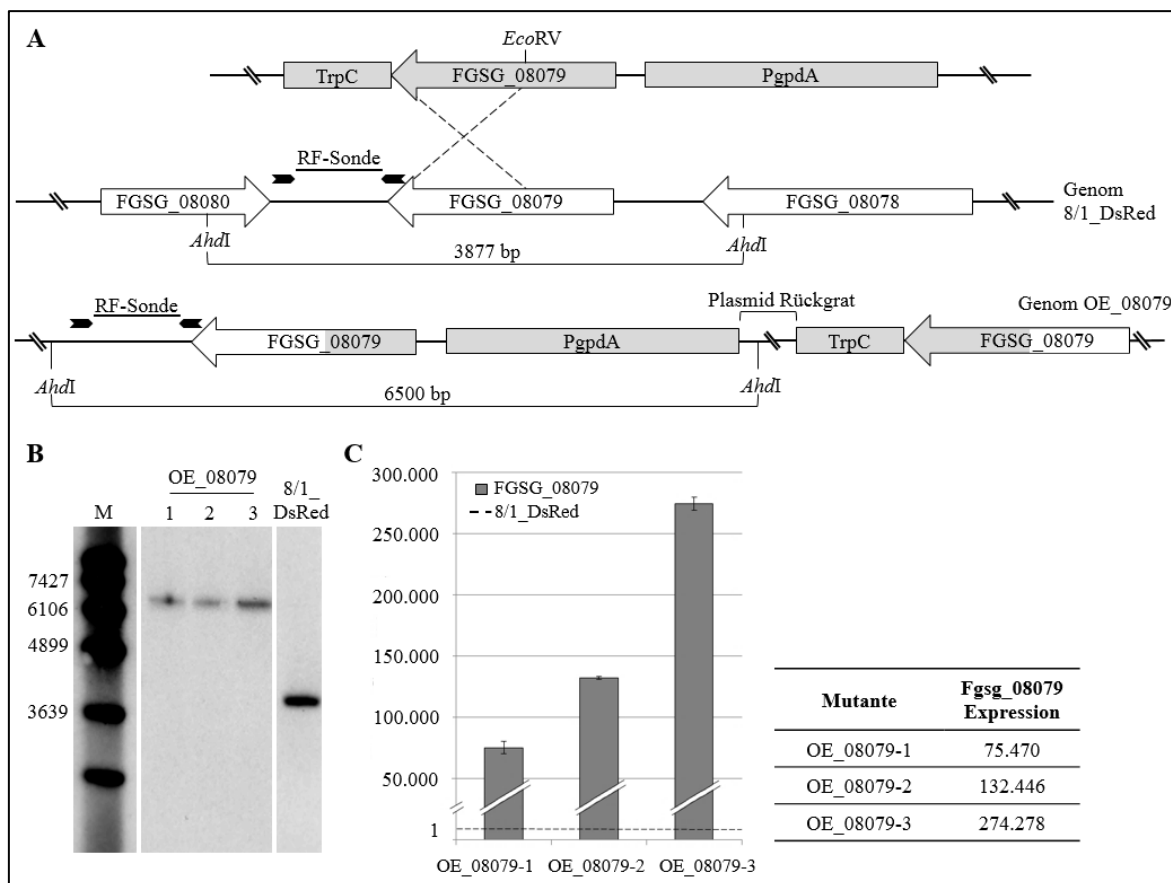


Abb. 20: Generierung von Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_08079 mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erhöhten Genexpression *in vitro*. **A** Schematische Darstellung der homologen Rekombination im Genlokus von FGSG_08079. Die Ligation der vollständigen FGSG_08079 Sequenz erfolgte über *Bam*HI Schnittstellen in den Vektor pAN7.1/GluA. Die Linearisierung des Überexpressionsplasmids erfolgte innerhalb des ORFs unter Verwendung des Restriktionsenzym *Eco*RV. Es erfolgte eine homologe Integration des Deletionskonstrukts in das *F. graminearum*-Genom des 8/1_DsRed Stammes via single crossover *in locus*, sodass zwei FGSG_08079 Sequenzen mit nativem Promotor bzw. *gpdA*-Promotor vorlagen. Zur Selektion der Transformanten diente eine Hygromycin-Resistenzkassette (*HygB*), welche im Rückgrat des Plasmids vorlag. Grau hinterlegte Bereiche spiegeln Fragmente des Plasmides wieder. Weiße Fragmente stehen für Sequenzbereiche des 8/1_DsRed Stammes. **B** Southern Blot Analyse von Transformanten. Hierfür wurde die mit *AhdI*-restringierte genomische DNA von 8/1_DsRed und der Überexpressionsmutanten (OE, engl. over expression) 1-3 mit einer Sonde für die rechte Flanke (RF-Sonde, siehe A) hybridisiert. In den Mutanten_1-3 konnte eine Bande von 6500 bp detektiert werden. 8/1_DsRed weist ein Signal bei 3877 bp auf. Marker (M) = DNA Molecular Weight Marker VII, DIG labeled (Roche). **C** qRT-PCR-Nachweis der verstärkten Expression von FGSG_08079 im Vergleich zum 8/1_DsRed in vitro, normalisiert auf die β -Tubulin Expression. Die Expressionsstärken liegen zwischen 75.000 und 274.000 im Vergleich zum Referenzstamm.

Die überprüften Mutanten wiesen eine um 75.000- bis 274.000 -fach erhöhte Expression im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed auf. Die Fusion der FGSG_08079 Gensequenz an den konstitutiven *gpdA* Promotor und die homologe Integration dieses Fusionsproduktes hat zu dessen Überexpression unter Kulturbedingungen geführt.

3.2.11 Die Überexpression von FGSG_08079 führt zu einer veränderten Expression der Butenolid-Clustergene während der Weizeninfektion

Der Nachweis für eine Überexpression unter Kulturbedingungen wurde erbracht (s. 3.2.10). Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von FGSG_08079 ebenfalls während der Weizeninfektion vorliegt und, ob diese zu einer Veränderung der Expression anderer Clustergene führt wurde eine *in planta* Expressionsanalyse für drei OE_08079 Mutanten durchgeführt. Wie schon für die Deletions- und Komplementationsmutanten wurden Weizenpflanzen an 2 Blüten punktinokuliert und nach 5 Tagen geerntet (2.2.9.2). Aus dem infizierten Pflanzenmaterial wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression aller Clustergene in den OE_08079 Mutanten und im 8/1_DsRed Stamm wurden in einer qRT-PCR bestimmt, auf die β -Tubulin Expression normalisiert und die Expressionsstärke aller Gene innerhalb der Mutanten im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 21 dargestellt.

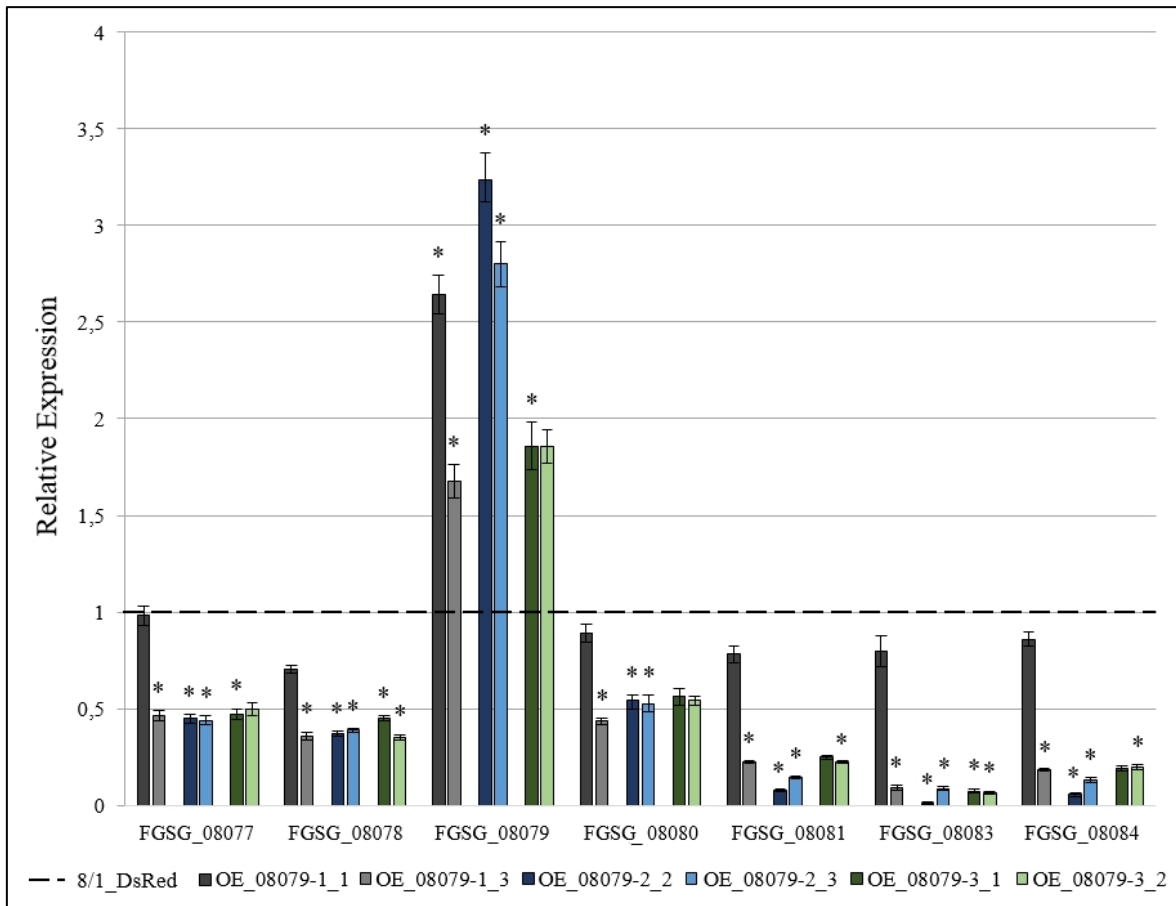


Abb. 21: *In planta* Expressionsanalyse der Gene des Butenolid-Clusters während der Weizeninfektion von OE_08079 Mutanten und des 8/1_DsRed (5dpi). Für die Expressionsanalyse der acht Gene des Butenolid-Clusters wurde die RNA von 2 biologischen Replikaten der OE_08079 Mutanten 1-3 isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine qRT-PCR mit Pilz-spezifischen β -Tubulin Primern und Primern für die Cluster-Gene durchgeführt. Durch die Verwendung des Programmes REST-348 (Relative Expression Software Tool; Pfaffl et al. 2002) wurde die Expressionsstärke aller Gene innerhalb der Mutanten im Vergleich zum 8/1_DsRed bestimmt (2.2.7.4). Pro Mutante wurden 2 biologische Replikate verwendet, die in der qRT-PCR Analyse jeweils mit 3 technischen Replikaten/Genexpression analysiert wurden. Ein Stern stellt eine signifikante Veränderung nach dem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl et al. 2002) dar. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. OE_08079-X gibt die jeweilige Überexpressionsmutante an (1-3). Der Nachsatz _X steht hierbei für das verwendete biologische Replikate (1-3).

Die Expressionsanalyse zeigt, dass die Expression von FGSG_08079 in allen OE_08079 Mutanten im Vergleich zum 8/1_DsRed erhöht ist. Betrachtet man sich die Expression der anderen Clustergene fällt auf, dass fast alle Gene signifikant in den Mutanten im Vergleich zum 8/1_DsRed runterreguliert sind. Trotz fehlender Signifikanz tendieren die Expressionen einzelner Gene zu einer verringerten Expression.

Die Mutante OE_08079-1_1 zeigt als einzige keine signifikante Veränderung bei allen Clustergenen mit Ausnahme der FGSG_08079 Expression. Anders verhält es sich mit den Mutanten OE_08079-1_3, OE_08079-2_2 und OE_08079-2_3. Hier sind alle nachgewiesenen Clustergene, mit Ausnahme der FGSG_08079 Expression, signifikant runterreguliert.

Die Mutante OE_08079-3_1 zeigt signifikante Runterregulationen nur für die Gene FGSG_08077, FGSG_08078 und FGSG_08083. Das zweite untersuchte biologische

Replikate dieser Mutante, OE_08079-3_2, wiederum für FGSG_08078, FGSG_08081, FGSG_08083 und FGSG_08084. Die Expression von FGSG_08082 konnte nicht nachgewiesen werden.

Die erhöhte Expression von FGSG_08079 im Vergleich zum Referenzstamm konnte für die OE_08079 Mutanten auch *in planta* nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine Runterregulation fast aller anderen Clustergene beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die konstitutive Expression von FGSG_08079 für diese Deregulation verantwortlich sein könnte.

3.2.12 Die erhöhte Expression von FGSG_08079 führt zu einer verringerten Butenolid-Synthese während der Weizeninfektion

Die Expressionsanalyse des Butenolid-Clusters der Überexpressionsmutanten während der Weizeninfektion hat eine generelle Runterregulation des Clusters im Vergleich zum Referenzstamm ergeben. Als nächster Schritt wurde überprüft, ob die Butenolid-Synthese dadurch beeinflusst wird. Für die Butenolid-Bestimmung wurden 100 mg gemörsertes Material verwendet. Dieses war identisch mit dem Material, welches für die vorherige Expressionsanalyse verwendet wurde. Die Messung von Butenolid fand mit einer LC-MS/MS Analyse statt. Des Weiteren wurde gDNA aus ca. 20 mg desselben Materials isoliert und die Konzentration an Pilz gDNA via qRT-PCR bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen Butenolid wurden anschließend auf die berechnete Menge an Pilz gDNA normalisiert. Die Ergebnisse der Butenolid-Bestimmung sind in der Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf gemessene gDNA Konzentrationen. Weizenpflanzen wurden entweder mit dem 8/1_DsRed Stamm, oder mit 3 unabhängigen OE_08078-Mutanten an 2 Blüten punktinokuliert und nach 5 Tagen geerntet. Aus ca. 20 mg Material wurde gDNA isoliert und mittels qRT-PCR und Pilz-spezifischen β -Tubulin Primern die enthaltene Menge an Pilz gDNA bestimmt. 100 mg Material wurden für eine LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid verwendet (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht.

Stamm	Replikatnr.	Butenolid [mg/kg]
8/1_DsRed	1	35,50
	2	33,04
	3	48,41
OE_08079-1	1	0,971
	2	3,486
	3	3,920
OE_08079-2	1	0,428
	2	2,110
	3	0,571
OE_08079-3	1	2,536
	2	1,728
	3	1,264

Mittels der LC-MS/MS Analyse konnte sowohl für den Referenzstamm 8/1_DsRed, als auch für alle drei Überexpressionsmutanten Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial nachgewiesen werden. Die gemessenen Butenolid-Konzentrationen für die OE_08079 Mutanten sind jedoch im Vergleich mit dem 8/1_DsRed stark verringert. So schwanken die Konzentrationen für alle überprüften Mutanten zwischen 0,428 mg/kg und 3,920 mg/kg. Der Referenzstamm 8/1_DsRed hingegen weist Butenolid Konzentrationen zwischen 33,04 mg/kg und 48,41 mg/kg auf.

Die zuvor nachgewiesene Überexpression des Clustergens FGSG_08079, bzw. die Deregulation des Genclusters *in planta* führt folglich zu einer verringerten Butenolid-Akkumulation.

3.2.13 Die Überexpression von FGSG_08079 führt zu einer Verringerung der Virulenz während der frühen Phase der Weizeninfektion

Die bisherigen Ergebnisse zu den Überexpressionsmutanten haben gezeigt, dass die konstitutive *in planta* Expression von FGSG_08079 sowohl zu einer Runterregulation fast aller anderen Clustergene führt und, dass möglicherweise dadurch die Butenolid-Synthese verringert ist. Ob dies einen Einfluss auf die Pathogenität und Virulenz der OE_08079 Mutanten hat wurde als nächstes überprüft. Hierbei wurde zunächst die frühe Infektionsphase untersucht. Dies fand zunächst, wie zuvor beschrieben, histologisch statt (s. 3.2.6, Abb. 17). Die Abbildung 22-A zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Es konnten keine Unterschiede zwischen den mit dem 8/1_DsRed Stamm und den mit den Überexpressionsmutanten infizierten Weizenblüten beobachtet werden.

Für eine genauere Charakterisierung der frühen Infektionsphase wurde eine molekulare Quantifizierung des Pilzmaterials in infiziertem Pflanzengewebe vorgenommen. Hierfür wurde das Material verwendet, welches ebenfalls für die Butenolid-Bestimmung in infiziertem Pflanzenmaterial verwendet wurde (s. 3.2.12). Für den Vergleich zwischen Mutanten und Referenzstamm wurde das Verhältnis der Mutanten gDNA zur gDNA des 8/1_DsRed Stammes berechnet. Das Ergebnis der molekularen Quantifizierung ist in Abbildung 22-B dargestellt.

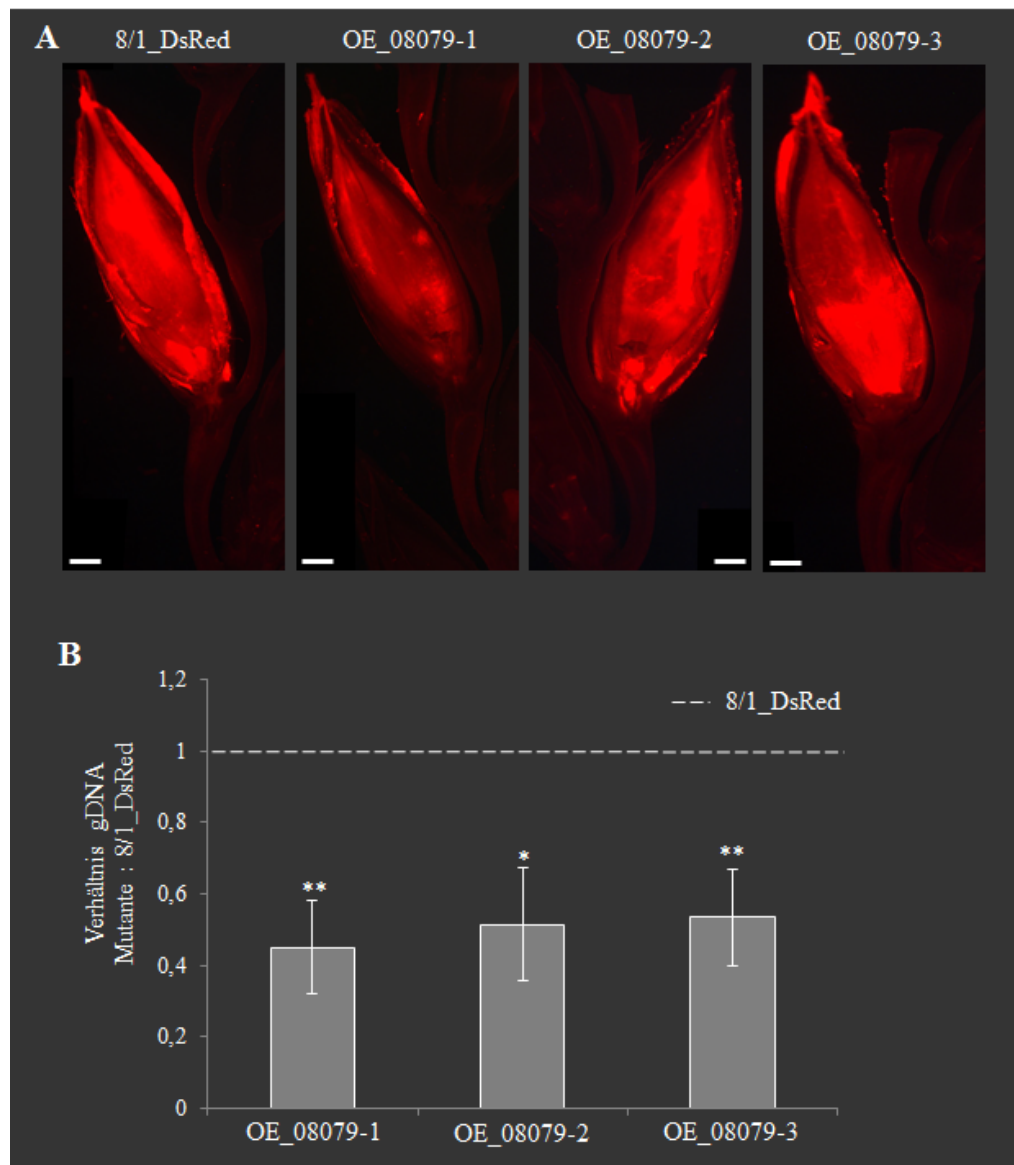


Abb. 22: Histologische Untersuchung (A) und Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR (B) von Überexpressionsmutanten. A Histologische Untersuchung von infizierten Weizenähren. Inokuliert mit dem 8/1_DsRed und jeweils drei unabhängigen OE_08079 Mutanten. Die Ernte erfolgte nach 5 dpi. Durch das integrierte rot fluoreszierende Protein DsRed in allen Pilzstämmen konnte deren Wachstum innerhalb der Pflanze visualisiert werden. Längenmaßstab: 1 mm. B Molekulare Quantifizierung von Pilz-gDNA. Aus infiziertem Pflanzenmaterial wurde gDNA isoliert und die Konzentration an Pilz gDNA mittels qRT-PCR bestimmt. Pro analysierter Mutante wurden 3 biologische Replikate untersucht. Für die Quantifizierung via qRT-PCR wurden jeweils 3 technische Replikate angefertigt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm) durchgeführt.

Die Quantifizierung hat ergeben, dass die gemessene gDNA Konzentration in infizierten Blüten für alle drei unabhängigen Überexpressionsmutanten im Vergleich zum 8/1_DsRed Referenzstamm signifikant verringert ist. Die OE_08079 Mutanten weisen eine verringerte Virulenz in der frühen Infektionsphase auf.

Um ausschließen zu können, dass die Überexpressionsmutanten generell ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum 8/1_DsRed aufweisen, wurde jeweils eine CM-Agarplatte mit

200 Konidien (10 µl, 20 K/µl) der drei unabhängigen Mutanten und des Referenzstammes inokuliert und für 3 Tage bei 28 °C inkubiert (Abb. 23).

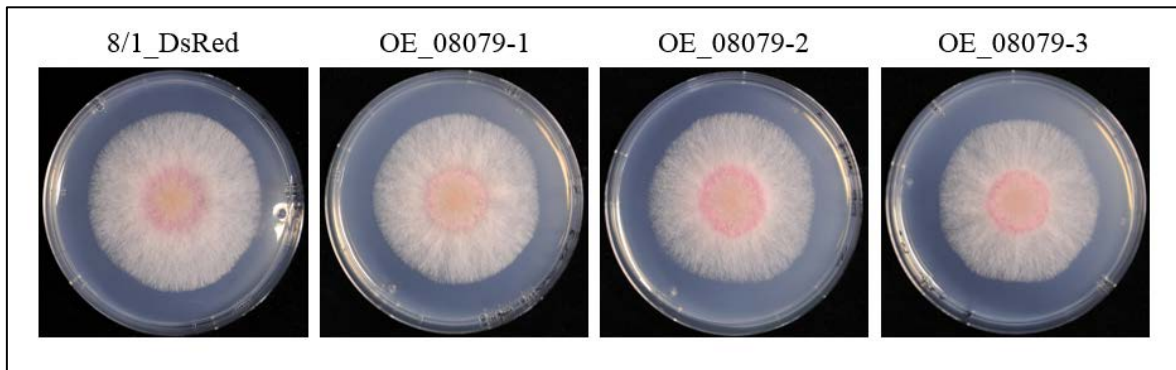


Abb. 23: Überprüfung des in vitro Wachstums auf CM-Agar. 200 Konidien des 8/1_DsRed Stammes und dreier OE_08079 Mutanten wurden in das Zentrum einer CM-Agarplatte pipettiert und für 3 Tage bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. Pro Stamm wurden drei technische Replikate angefertigt.

Wie die Abbildung 23 zeigt wachsen die Überexpressionsmutanten auf CM-Agar wie der 8/1_DsRed Referenzstamm. Folgerichtig ist die verlangsamte Kolonisierung der Weizenblüte nicht auf einen generellen Wachstumsdefekt zurückzuführen.

Die nächste Frage, die es zu klären galt, war, ob sich die verringerte Virulenz in der frühen Infektionsphase auf das generelle Infektionsverhalten der OE_088079 Mutanten auswirkt. Nach der Punktinokulation von Weizenähren mit Konidien der Mutanten bzw. des Referenzstammes wurde deshalb das Schadbild nach 21 Tagen ausgewertet (Abb. 24).



Abb. 24: Überprüfung der Pathogenität generierter OE_08079 Mutanten auf Weizen des Kultivars „Nandu“. Schadbilder von Weizenähren nach erfolgreicher Infektion mit *F. graminearum* OE_08079- Mutanten und dem 8/1_DsRed, 21 dpi. Weizenblüten wurden im Entwicklungsstand der Anthesis mit 200 Konidien des zu untersuchenden Stammes an zwei Blüten punkt-inokuliert (weiße Pfeilspitze). Der 8/1_DsRed diente als Positivkontrolle (vollständige Infektion der Weizenähre) und eine Inokulation mit sterilem Wasser als Negativkontrolle (FHB-Symptom freie Ähre). Nach 21 Tagen zeigten sowohl die Ähren, die mit dem Referenzstamm inokuliert wurden, als auch die mit den OE_08079 Mutanten inokulierten Ähren die typischen Symptome der Ährenbleiche. Pro untersuchten Pilzstamm wurden 10 Ähren inokuliert.

Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, zeigen alle OE_08079 Mutanten das typische Ausbleichen der Ähre nach 21 Tagen. Die Virulenz ist mit der des Referenzstammes 8/1_DsRed vergleichbar.

Demnach scheint die zuvor beobachtete verringerte Virulenz nur die frühe Infektionsphase zu betreffen. Die Deregulation des Clusters und die reduzierte Butenolid-Akkumulation zu diesem Zeitpunkt haben keinen Einfluss auf das generelle Infektionsverhalten der OE_08079 Mutanten.

3.2.14 Die verringerte *in planta* Butenolid-Synthese der Überexpressionsmutanten hat keinen Einfluss auf die Synthese des Mykotoxins Deoxynivalenol

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Überexpressionsmutanten sowohl *in vitro*, als auch *in planta* eine erhöhte Expression von FGSG_08079 im Vergleich zum Referenzstamm aufweisen. Allerdings ist die Butenolid-Synthese nach 5 Tagen deutlich im Vergleich zum 8/1_DsRed verringert. Des Weiteren zeigen die Mutanten eine Verringerung in der Virulenz in der frühen Phase der Infektion.

Wie eingangs erwähnt ist DON ein wichtiger Virulenzfaktor für die Kolonisierung des Rachisknotens einer Weizenblüte. Zu Beginn dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass das Fehlen von DON bereits während der frühen Infektionsphase zu einer drastischen Reduktion des Pilzwachstums während der Kolonisierung der Weizenblüte führt. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob und in welchem Maße DON von den Überexpressionsmutanten während der Infektion synthetisiert wird. Die DON Bestimmung fand mittels LC-MS/MS Analyse statt. Das verwendete Material war identisch zu dem analysierten in Kapitel 3.2.11 und 3.2.12. Die ermittelte Menge an pilzlicher gDNA wurde ebenfalls aus diesen Kapiteln für die Normalisierung der DON Konzentrationen übernommen. Das Ergebnis ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf berechnete gDNA Konzentrationen des Pilzes. Aus ca. 20 mg infiziertem Pflanzenmaterial wurde gDNA isoliert und mittels qRT-PCR und Pilz-spezifischen β -Tubulin Primern die enthaltene Menge an Pilz gDNA bestimmt. 100 mg Material wurden für eine LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von Butenolid verwendet (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Das Material war identisch zu dem aus Kapitel 3.2.11 und 3.3.12. Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht.

Stamm	Replikatnr.	DON [mg/kg]
8/1_DsRed	1	126,80
	2	164,21
	3	318,71
OE_08079-1	1	230,57
	2	214,03
	3	200,09
OE_08079-2	1	118,64
	2	236,79
	3	193,93
OE_08079-3	1	137,25
	2	187,76
	3	107,86

Die Tabelle 18 zeigt, dass die Konzentrationen an synthetisiertem DON während der Weizeninfektion innerhalb der biologischen Replikate für alle getesteten Stämme starken Schwankungen unterliegen. So reichen die ermittelten DON Konzentrationen für den 8/1_DsRed Stamm von 126,80 mg/kg bis 328,71 mg/kg. Die Überexpressionsmutante OE_08079-1 weist Konzentrationen zwischen 200,09 mg/kg und 230,57 mg/kg DON auf. Für die Mutanten OE_08079-2 und 3 konnten zum Teil DON-Konzentrationen gemessen werden, die im Vergleich zum Referenzstamm 8/1_DsRed teilweise niedriger waren. Die Überexpressionsmutanten sind demnach in der Lage, DON zu synthetisieren. Dass die beobachtete Reduktion der Virulenz auf fehlende oder wesentlich geringere DON Konzentrationen zurückzuführen ist kann somit ausgeschlossen werden.

3.2.15 Unter DON-induzierenden Bedingungen *in vitro* weisen OE_08079 Mutanten eine verringerte DON-Synthese auf

Dass die Überexpressionsmutanten DON im selben Maß während der Infektion produzieren können wie der Referenzstamm 8/1_DsRed wurde im vorherigen Kapitel nachgewiesen (3.2.14). Dass sich die DON- Induktion *in planta* jedoch von einer *in vitro* Induktion der DON-Synthese unterscheiden kann hat sich ebenfalls gezeigt (3.2.8).

Ob sich die DON-Synthese in den OE_08079 Mutanten *in vitro* induzieren lässt und, ob es dabei Unterschiede zur *in planta* Induktion gibt wurde in einem nächsten Schritt überprüft. Hierbei wurden die Mutanten wie bereits beschrieben kultiviert und die Induktion eingeleitet. Welche DON-Konzentrationen hierbei entstanden sind und via LC-MS/MS gemessen wurden sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

Tab. 19: Bestimmung von DON via LC-MS/MS unter *in vitro* Induktionsbedingungen. Nach einer 3-tägigen Anzucht in CM folgte die Überführung von 1 g Myzel in 50 ml „MYRO“ Medium versetzt mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zur Induktion der DON Synthese. Nach 3, 4 und 6 dpi wurden 2 ml Medium/Myzel Gemisch abgenommen, zentrifugiert und die Konzentration an DON im Überstand mittels LC-MS/MS bestimmt (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Neben den dargestellten Einzelwerten (EW) wurden Mittelwerte (MW) aus 2 Replikaten gebildet. Fett geschriebene Messwerte wurden nicht für die Berechnung verwendet. Pro analysiertem Stamm wurden 3 biologische Replikate analysiert.

DON [mg/kg]									
	Replikat nr.	8/1_DsRed		OE_08079-1		OE_08079-2		OE_08079-3	
		EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
3 dpi	1	39,65		18,61		151,4		59,58	
	2	82,67	91,2	0,00	0,00	93,01	122,3	0,98	59,8
	3	99,68		0,00		20,26		59,94	
4 dpi	1	48,49		36,73		272,6		128,7	
	2	118,0	143,9	72,16	37,4	175,8	224,2	76,30	124,4
	3	169,9		37,99		53,94		120,1	
6 dpi	1	97,59		71,57		502,5		128,3	
	2	192,3	214,8	120,0	119,3	1,22	46,9	121,6	124,9
	3	237,2		118,5		92,59		4,43	

Die Auswertung der DON-Konzentrationen hat zunächst ergeben, dass wieder generell eine Zunahme an DON im Verlauf der Probennahme messbar war. Eine Verringerung der DON-Konzentration konnte für das zweite Replikat der OE_08079-2 Mutante beobachtet werden. Nach einem Anstieg bei 4 dpi auf 175,8 mg/kg DON fällt diese nach 6 dpi auf 1,22 mg/kg ab. Ähnliches kann für OE_08079-3, Replikat 3, beobachtet werden (4 dpi= 76,30 mg/kg; 6 dpi= 4,43 mg/kg).

Für den Vergleich der DON-Konzentrationen wurden aus den zwei ähnlichsten Einzelwerten eines Zeitpunktes pro Mutante ein Mittelwert gebildet (s. Tab. 19, MW). Beim Vergleich der OE_08079 Mutanten mit dem Referenzstamm wird deutlich, dass die Mutante OE_08079-1 zu allen Zeitpunkten weniger DON produziert. Dies wird sowohl anhand der Einzelwerte, als auch an den gebildeten Mittelwerten gezeigt. Für zwei Replikate konnte nach 3 dpi keinerlei DON nachgewiesen werden. Diese Mutante war jedoch im Infektionsprozess in der Lage, generell mehr DON zu produzieren als zwei Replikate des 8/1_DsRed. Die Induktion *in vitro* führt folglich zu einer geringeren DON-Synthese in dieser Mutante als während der Infektion.

Die OE_08079-3 Mutante weist zu den Zeitpunkten 3 (59,8 mg/kg) und 6 dpi (124,9 mg/kg) geringere DON Konzentrationen bei der *in vitro* Induktion auf als der Referenzstamm (3 dpi= 91,2 mg/kg; 6 dpi= 214,8 mg/kg). Nach 4 dpi sind nur leichte Verringerungen zu beobachten. Die für die Mutante OE_08079-1 beobachteten Unterschiede zwischen der *in vitro* und der *in planta* Induktion sind hier nicht gegeben. Während der Infektion produzierte OE_08079-3 ebenfalls geringere DON-Konzentrationen als der Referenzstamm.

Mutante OE_08079-2 zeigt sowohl nach 3 dpi (122,3 mg/kg), als auch nach 4 dpi (224,2 mg/kg) eine höhere DON-Konzentration als der Referenzstamm (3 dpi= 91,2 mg/kg; 4 dpi= 143,9 mg/kg). Zum Zeitpunkt 6 dpi verringert sich die für diese Mutante gemessene Menge an DON auf 46,9 mg/kg, während für den 8/1_DsRed Stamm eine Konzentration von 214,8 mg/kg DON gemessen werden konnte.

Wie bereits gezeigt, sind die Überexpressionsmutanten nicht in der Lage, Butenolid in dem Maße während der Infektion zu synthetisieren wie der Referenzstamm. Die gemessenen Konzentrationen waren sehr gering. Ob dies auch unter Kulturbedingungen zutrifft wurde ebenfalls anhand der abgenommenen Überstände überprüft (Tab. 20).

Tab. 20: Bestimmung von Butenolid via LC-MS/MS unter *in vitro* Induktionsbedingungen. Nach einer 3-tägigen Anzucht in CM folgte die Überführung von 1 g Myzel in 50 ml Minimalmedium versetzt mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ zur Induktion der Butenolid Synthese. Nach 3, 4 und 6 dpi wurden 2 ml Medium/Myzel Gemisch abgenommen, zentrifugiert und die Konzentration an Butenolid im Überstand mittels LC-MS/MS bestimmt (durchgeführt von Professor Dr. Rainer Schuhmacher, Universität für Bodenkultur, Wien, Österreich). Neben den dargestellten Einzelwerten (EW) wurden Mittelwerte (MW) aus 2 Replikaten gebildet. Fett geschriebene Messwerte wurden nicht für die Berechnung verwendet. Pro analysiertem Stamm wurden 3 biologische Replikate analysiert.

Butenolid [mg/kg]									
		8/1_DsRed		OE_08079-1		OE_08079-2		OE_08079-3	
	Replikat nr.	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
3 dpi	1	0,00		0,59		4,63		0,58	
	2	1,01	0,74	0,00	0,00	2,14	1,52	0,26	0,43
	3	0,45		0,00		0,89		1,29	
4 dpi	1	0,00		0,86		3,95		2,17	
	2	0,39	0,65	1,16	0,79	1,18	0,98	2,29	2,23
	3	0,91		0,72		0,77		0,88	
6 dpi	1	0,00		0,92		1,75		1,49	
	2	1,09	0,54	0,79	0,86	0,70	0,69	1,61	1,55
	3	2,56		1,09		0,67		1,13	

Bis auf die Replikate 2 und 3 der OE_08079-1 Mutante (3 dpi) und alle Zeitpunkte des ersten Replikates des 8/1_DsRed Stammes konnte in jedem Überstand Butenolid gemessen werden. Die gemessenen Butenolid-Konzentrationen unterscheiden sich innerhalb der biologischen Replikate teilweise sehr. Für einen Vergleich wurden aus diesem Grund Mittelwerte (MW) aus den zwei ähnlichsten Einzelwerten (EW) eines Zeitpunktes pro Stamm gebildet (Tab. 20, MW). Zum Zeitpunkt 3 dpi produzierte der Referenzstamm im Durchschnitt 0,74 mg/kg Butenolid. Während für die Mutante OE_08079-1 zu diesem Zeitpunkt kein Butenolid nachweisbar war, wies OE_08079-2 die zweifache Menge an Butenolid auf (1,52 mg/kg). Für die Mutante OE_08079-3 wurden 0,43 mg/kg Butenolid gemessen.

Nach 4 dpi konnten für alle OE_08079 Mutanten höhere Butenolid-Konzentrationen nachgewiesen werden als für den 8/1_DsRed Stamm. Dieser produzierte im Mittel 0,65 mg/kg Butenolid. Für OE_08079-1 bis -3 wurden 0,79 mg/kg, 0,98 mg/kg und 2,23 mg/kg Butenolid gemessen. Gleiches konnte nach 6 dpi beobachtet werden. Die mittlere Butenolid-Konzentration für den Referenzstamm lag bei 0,54 mg/kg Butenolid, während die Mutanten 0,86 mg/kg (OE_08079-1), 0,69 mg/kg (OE_08079-2) und 1,55 mg/kg (OE_08079-3) Butenolid synthetisierten.

Während der Infektion konnte für die OE_08079 Mutanten eine deutliche Verringerung an synthetisiertem Butenolid nachgewiesen werden. Die LC-MS/MS Analyse der Kulturüberstände hat ergeben, dass die OE_08079 Mutanten unter *in vitro* Bedingungen in der Lage sind, mehr Butenolid zu produzieren als der Referenzstamm 8/1_DsRed.

3.2.16 Das Sekundärmetabolit Butenolid führt zum Einbruch der ATP-gekoppelten Respiration in Weizenvorspelzen

Bisher wurde untersucht, welche Bedeutung das von *F. graminearum* produzierte Sekundärmetabolit Butenolid während der Infektion von Weizen hat. In einem nächsten Schritt galt es nun herauszufinden, welche Wirkung Butenolid auf die Pflanze hat. Wang et. al (2008) haben herausgefunden, dass Butenolid auf isolierte Mitochondrien des Herzmuskelgewebes von Ratten wirkt. Das mitochondriale Membranpotential wird durch die Behandlung mit Butenolid verringert.

Um zu überprüfen, ob pflanzliche Mitochondrien ebenfalls Veränderungen durch die Behandlung mit Butenolid aufweisen wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, engl. oxygen consumption rate) von Weizenvorspelzen bestimmt. Durch die Zugabe von spezifischen Inhibitoren können einzelne Komplexe inhibiert und der Sauerstoffverbrauch der Zelle unterbrochen werden. Somit kann die Effizienz der Komplexe bestimmt werden. Für die Bestimmung der OCR wurden aus Weizenblüten präparierte und gewaschene Vorspelzen verwendet. Die Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs wurde in Kooperation mit Herrn Daniel Schniertshauer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Bergemann (Universität Albstadt-Sigmaringen) durchgeführt.

Vor der OCR-Bestimmung wurden die Spelzen zunächst für 30, 60 oder 180 min in Assaymedium mit einer Konzentration von 80 µg/ml Butenolid bzw. ohne Butenolidzugabe (Kontrolle) inkubiert. Als erstes wurde die basale Atmung bestimmt. Diese setzt sich aus der mitochondrialen und der nicht-mitochondrialen Atmung zusammen (vgl. Abb. 25, Messpunkt A). Es folgte die Zugabe von Oligomycin als Inhibitor der ATP-Synthase zum Medium. Dies führt zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Atmung, da keine Protonen mehr in die Mitochondrienmatrix gepumpt werden können. Die Abnahme der Respiration kann somit als ein Maß für die ATP-Produktion der Mitochondrien angesehen werden (vgl. Abb. 25, Messpunkt B). Die Entkopplung der Atmungskette und der dadurch resultierende ungehemmte Einstrom von Protonen ermöglicht eine maximale Respiration (vgl. Abb. 25, Messpunkt C). Dies wurde durch die Zugabe von Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) hervorgerufen. Anschließend wurden Rotenon und Antimycin A (Komplex I- bzw. Komplex III- Inhibitor) hinzugegeben. Die OCR Messwerte sinken in der Folge ab (vgl. Abb. 25, Messpunkt D). Die Abbildung 25 zeigt den

Kurvenverlauf der OCR-Bestimmung beispielhaft sowohl für Butenolid-behandelte Spelzen (30/60/180 min BUT) als auch für die unbehandelte Kontrolle. Die Kurvenverläufe aller behandelten Spelzen liegen der Arbeit als Anhang bei (Anhang 8.2-A bis D, Abb. 50-53).

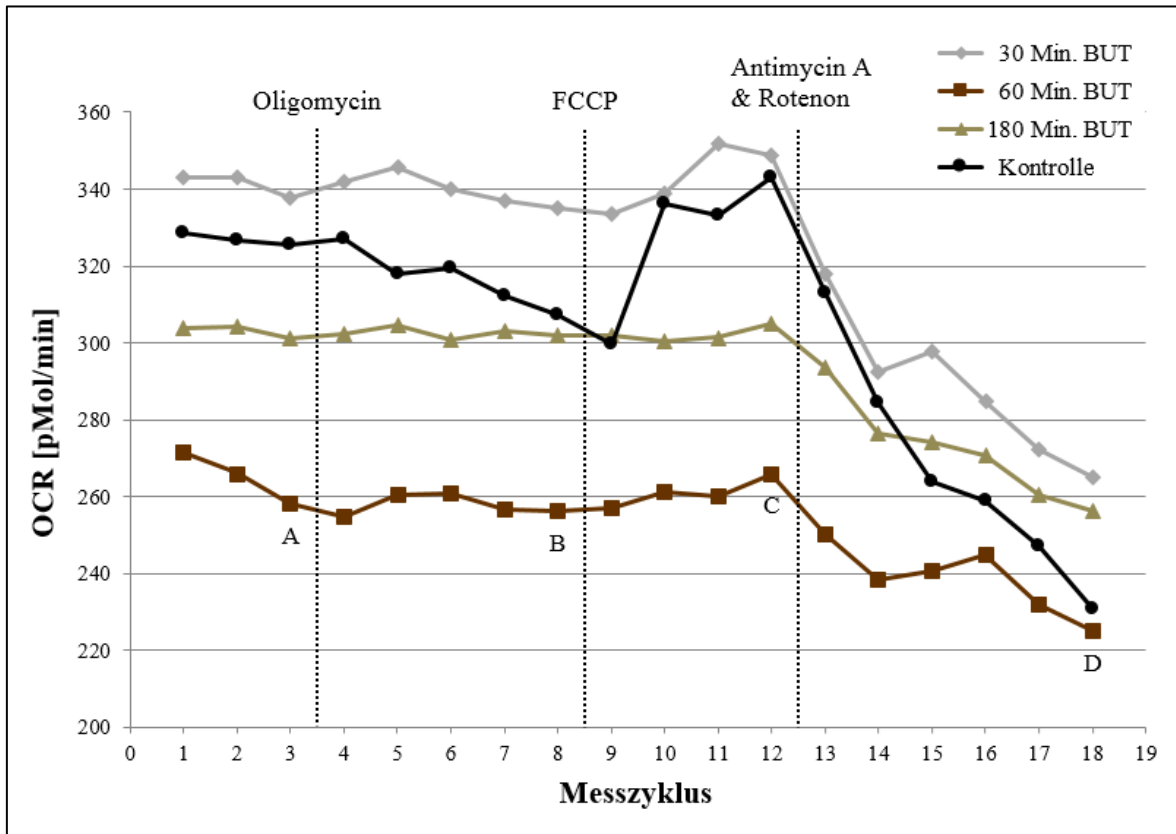


Abb. 25: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen. Spelzen wurden mit der konkav-gewölbten Seite nach unten auf ein Netzchen (1 Spelze/Netzchen) einer „Islet Capture-Plate“ (Seahorse) gelegt und mit entweder 450 µl reinem Assay-Medium (Kontrolle) oder mit synthetischem Butenolid versetzten Assay Medium (Endkonz. 80 µg/ml) versetzt. Die Inkubationszeiten in Assay-Medium + Butenolid lagen bei 30, 60 und 180 min vor dem Beginn der Messung. Die Kontroll-Spelzen wurden für 180 min inkubiert. Es folgte zunächst die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (eng. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

Bei der Betrachtung der Messergebnisse für den Sauerstoffverbrauch behandelter und unbehandelter Spelzen fällt auf, dass die OCR in Messzyklus 1 nicht für alle Spelzen gleich ist. Diese Unterschiede wurden jedoch sowohl innerhalb aller gemessenen Kontrollspelzen, als auch innerhalb aller behandelten Spelzen beobachtet und ist somit nicht auf die Butenolid-Behandlung zurückzuführen (s. Anhang 8.2-A bis D, Abb. 50-53).

Des Weiteren kann beobachtet werden, dass die OCR der Kontrolle nach der Zugabe von Oligomycin stärker abfällt als die der Butenolid-behandelten Spelzen. Da Oligomycin die ATP-Synthase blockiert könnte dies ein erster Hinweis auf die Wirkung von Butenolid sein. Außerdem führt die Zugabe von FCCP zu keinem hohen Anstieg der OCR behandelter

Spelzen. Die Mitochondrienmembran kann demnach nicht in dem Maße für Protonen durchlässig gemacht werden wie für die Kontrollspelzen.

Für eine genauere Analyse der Effizienzen der einzelnen Komplexe wurden unterschiedliche Aspekte der Atmung berechnet. Hierfür wurden die Messwerte sechs biologischer Replikate aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten verwendet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in den folgenden Abbildungen 26 bis 28 graphisch dargestellt.

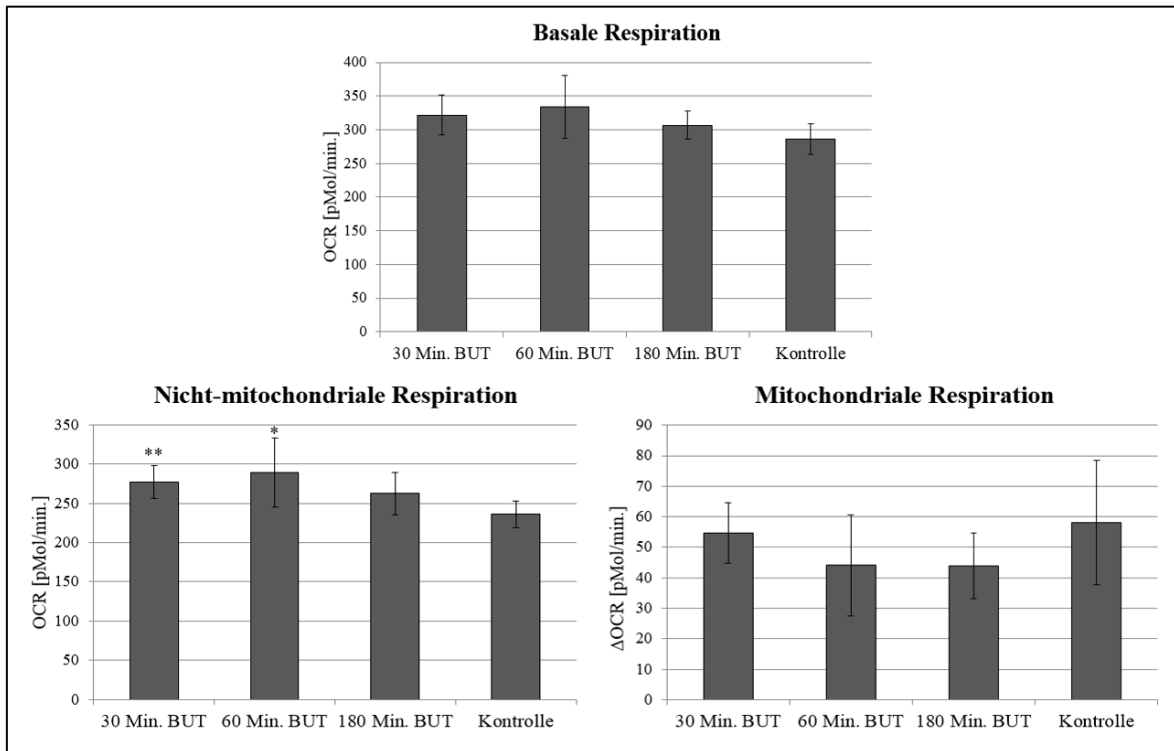


Abb. 26: Vergleich der basalen Respiration Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate. Für die Bestimmung der basalen Respiration in behandelten und unbehandelten Vorspelzen wurde der OCR-Wert des Messwertes A (vgl. Abb. R25) kurz vor der Zugabe von Oligomycin zum Assay-Medium verwendet. Die basale Respiration setzt sich aus der nicht-mitochondrialen (NMR) und der mitochondrialen Respiration (MR) zusammen. Für die Bestimmung der NMR wurde die OCR des Messpunktes D herangezogen. Durch die Zugabe von Antimycin A und Rotenon wird die MR blockiert. Der verbleibende Sauerstoffverbrauch ist somit auf die NMR zurückzuführen. Die MR wird bestimmt, indem die OCR der NMR von der der basalen Respiration abgezogen wird (Δ OCR, Differenz der Messpunkte A und D). Für jede untersuchte Bedingung wurden 6 biologische Replikate aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) durchgeführt und beziehen sich immer auf die unbehandelten Kontrollspelzen (Kontrolle).

Für die Bestimmung der basalen Respiration (mitochondriale und nicht-mitochondriale Respiration), wurde lediglich der Wert vor der Zugabe von Oligomycin benötigt (Messpunkt A, Abb. 25). Für die Berechnung der mitochondrialen Respiration (MR) wurde die Differenz der OCR (Δ OCR) von Messpunkt A und D gebildet. Die nicht-mitochondriale Respiration (NMR) wird anhand des Messpunktes D ersichtlich, da durch die Zugabe von Rotenon und Antimycin die mitochondriale Atmung vollständig geblockt wird. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, gibt es bei der basalen Atmung keine signifikanten Unterschiede. Unterteilt man

jedoch diese in die NMR und die MR fällt auf, dass die NMR in Spelzen, die 30 bzw. 60 min mit Butenolid behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist. Die MR zeigt keine signifikanten Veränderungen.

Dies deutet darauf hin, dass Butenolid einen Effekt auf die NMR, nicht jedoch auf die MR hat.

Als nächstes wurde die ATP-gekoppelte Respiration berechnet. Hierfür wurde die gemessene OCR an Messpunkt B von der ermittelten OCR an Messpunkt A abgezogen. Damit einhergehend wurde überprüft, ob die Protonendurchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran durch die Behandlung mit Butenolid verändert ist (Abb. 27).

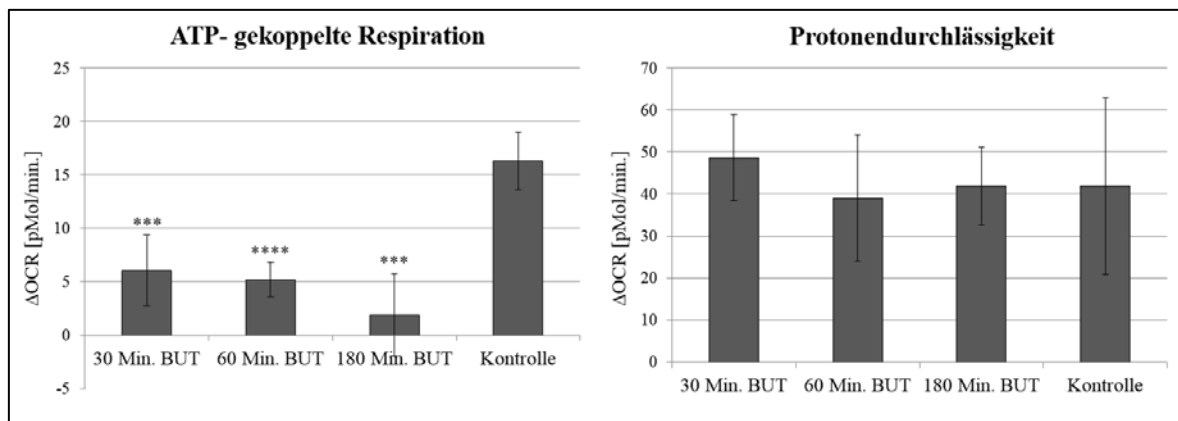


Abb. 27: Vergleich der ATP-gekoppelten Respiration und der Protonendurchlässigkeit Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate. Für die Bestimmung der ATP-gekoppelten Respiration in behandelten und unbehandelten Weizenvorspelzen wurde die Differenz der OCR-Werte der Messpunkte A und B gebildet. (ΔOCR ; vgl. Abb. 25). Die Zugabe von Oligomycin führt zur Inhibierung der mitochondrialen ATP-Synthase. Der darauf folgende Abfall der OCR gilt als Maß für die ATP-Synthase in den Mitochondrien. Für die Bestimmung der Protonendurchlässigkeit wurde die OCR Differenz der Messpunkte B und D gebildet. Für jede untersuchte Bedingung wurden 6 biologische Replikate aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) durchgeführt und bezieht sich immer auf die unbehandelten Kontrollspelzen (Kontrolle).

Die Ergebnisse in Abbildung 27 zeigen eine starke Verringerung der ATP-gekoppelten Respiration nach Inkubation mit 80 $\mu\text{g/ml}$ Butenolid im Vergleich zur Kontrolle. Unterschiede in der Protonendurchlässigkeit (Differenz Messpunkt B und D) konnten nicht beobachtet werden.

Die Behandlung der Spelzen mit Butenolid führt zu keiner Verringerung in der OCR, wenn die ATP-Synthase durch Oligomycin blockiert wird. O_2 kann demnach weiterhin verbraucht, also zu H_2O reduziert werden. Dies konnte zuvor bei der Betrachtung der Kurvenverläufe ebenfalls beobachtet werden. Da ebenfalls keine erhöhte Protonendurchlässigkeit nachgewiesen werden konnte, geschieht dies ohne einen erhöhten Einstrom von Protonen in die Matrix.

Des Weiteren wurde überprüft, ob es Veränderungen im maximalen Sauerstoffverbrauch gibt. Hierfür wurde die ermittelte OCR an Messpunkt D von der OCR des Messpunktes C abgezogen (vgl. Abb. 25). Das Ergebnis ist in Abbildung 28 dargestellt.

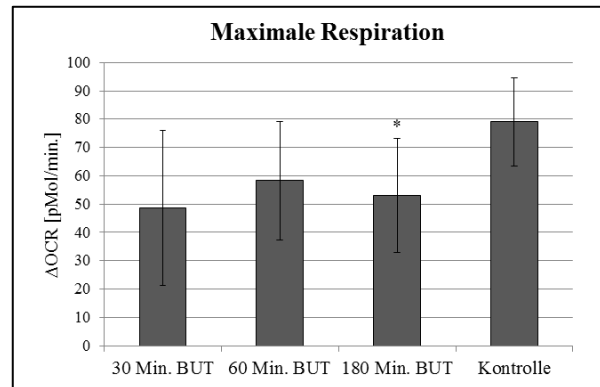


Abb. 28: Vergleich der maximalen Respiration Butenolid-behandelter und unbehandelter Weizenvorspelzen im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate. Für die Bestimmung der maximalen Respiration in behandelten und unbehandelten Weizenvorspelzen wurde die Differenz der OCR-Werte der Messpunkte C und D gebildet. (Δ OCR; vgl. Abb. 25). Die Zugabe von FCCP führt zum ungehemmten Einstrom an Protonen in die Mitochondrienmatrix. Die Behandlung mit Rotenon und Antimycin A hat die Inhibierung der Komplexe I und III zur Folge, wodurch die mitochondriale Atmung vollständig blockiert wird. Für jede untersuchte Bedingung wurden 6 biologische Replikate aus mindestens 2 unabhängigen Experimenten analysiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Eine Signifikanzanalyse wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) durchgeführt und beziehen sich immer auf die unbehandelten Kontrollspelzen (Kontrolle).

Bei Betrachtung des Ergebnisses zur maximalen Respiration (Abb. 28) konnte nur ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollspelzen und einer Inkubation für 180 min mit Butenolid beobachtet werden. Hier ist die maximale Respiration verringert.

Zusammengefasst konnte ein Einfluss von Butenolid auf die Respiration von Weizenvorspelzen beobachtet werden. Dieser äußert sich zum einen in einer Erhöhung der NMR im Vergleich zu unbehandelten Kontrollspelzen. Ein drastischer Effekt konnte zum anderen bei der ATP-gekoppelten Respiration beobachtet werden. Die Behandlung mit Oligomycin führt zu keinem Abfall in der OCR trotz Inhibierung der ATP-Synthase. Folglich kann weiterhin O_2 verbraucht werden, ohne dass durch die ATP-Synthase Protonen in die Matrix geschleust werden. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass alternative Oxidationsprozesse durch die Behandlung mit Butenolid induziert wurden. Des Weiteren konnte eine leichte Reduktion der maximal möglichen Respiration in behandelten Spelzen ermittelt werden.

Als nächstes galt es herauszufinden, ob der zuvor beschriebene Einfluss von Butenolid ebenfalls während der Infektion beobachtet werden kann. Es wurden Vorspelzen mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante bzw. H_2O (Kontrolle) inokuliert. Nach 6 Tagen erfolgte die Messung der OCR inokulierter Spelzen wie zuvor beschrieben. Exemplarische

Kurvenverläufe sind in der Abbildung 29 dargestellt. Die Kurvenverläufe aller inokulierten Spelzen liegen der Arbeit als Anhang bei (Anhang 8.2-E bis G, Abb. 54-56).

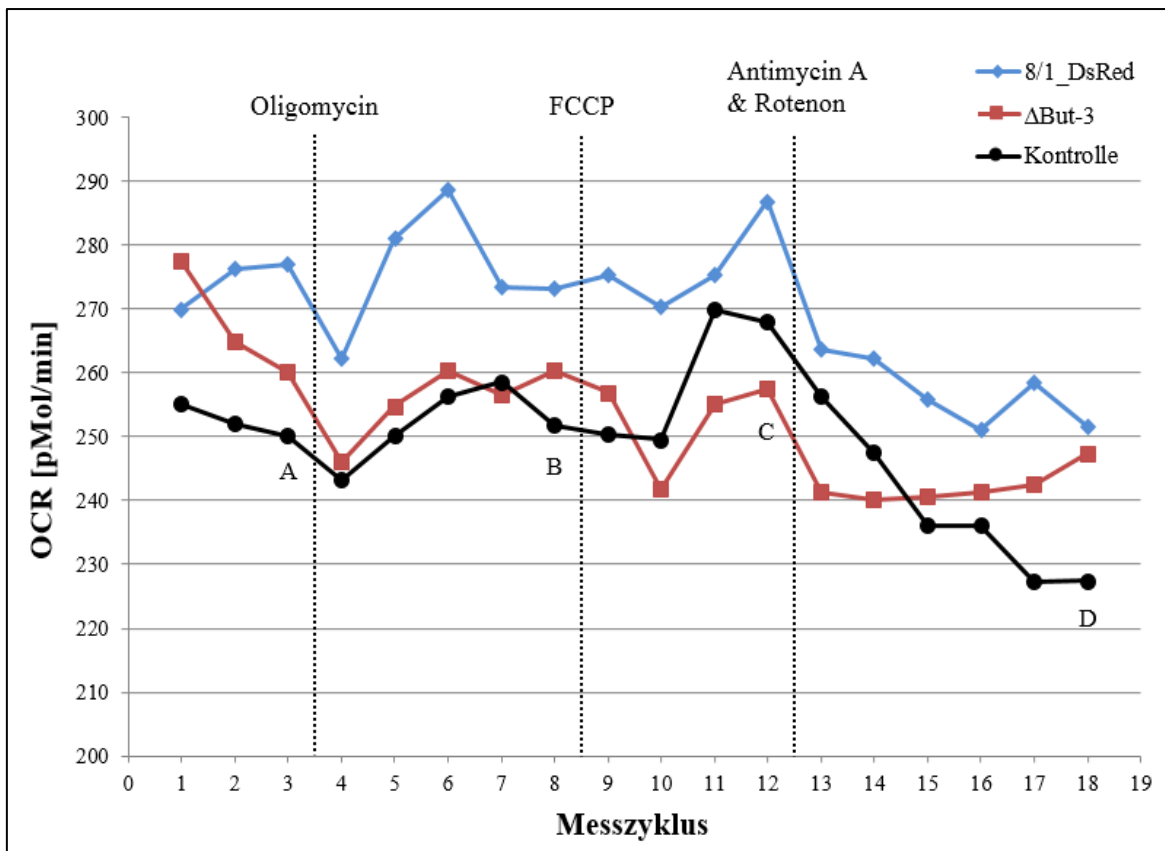


Abb. 29: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate in Weizenvorspelzen, inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der ΔBut-3 Mutante oder H₂O, 6dpi. Infizierte Spelzen wurden mit der konkav-gewölbten Seite nach unten auf ein Netzchen (1 Spelze/Netzchen) einer „Islet Capture-Plate“ (Seahorse) gelegt. Es folgte die Zugabe von 450 µl Assay-Medium. Zunächst wurde die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (eng. Oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe durchgeführt. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 Min. (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden. 8/1_DsRed und ΔBut-3 geben die Stämme an, mit denen Spelzen inokuliert wurden. Die Kontrolle bezieht sich auf Vorspelzen die mit Wasser inokuliert wurden.

Als erstes wurde sich das Verhalten der Kontrollspelzen näher betrachtet. Hier fällt auf, dass sich der Kurvenverlauf dieser Kontrollspelzen im Vergleich zur Kontrolle des vorherigen Experiments verändert hat. Es kommt zu keinem Abfall der OCR nach der Zugabe von Oligomycin, sondern zu einem Anstieg. Die Aktivität der ATP-Synthase, die durch eine Behandlung mit Oligomycin blockiert wird, ist verändert. Keine deutliche Abnahme der OCR konnte ebenfalls für die mit Konidien inokulierten Spelzen beobachtet werden. Der Anstieg der OCR nach der Zugabe von FCCP kann nur bei der Kontrolle und bei Spelzen, inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, beobachtet werden. Nach der Zugabe von Antimycin und Rotenon fallen die OCR Werte für alle getesteten Spelzen ab.

Für eine genauere Analyse der Effizienzen der einzelnen Komplexe wurden wie zuvor die unterschiedlichen Aspekte der Atmung berechnet. Hierfür wurden die Messwerte von 14

biologischen Replikate aus mindestens drei unabhängigen Experimenten verwendet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in den folgenden Abbildungen 30 bis 32 graphisch dargestellt. Für die Bestimmung der basalen Respiration wurde wieder der Wert vor der Zugabe von Oligomycin benötigt (Messpunkt A, Abb. 29). Die Berechnung der MR erfolgte durch die Bildung der Differenz der OCR (Δ OCR) von Messpunkt A und D. Die NMR wird anhand des Messpunktes D ersichtlich (Inhibierung der MR durch Rotenon und Antimycin) (Abb. 30).

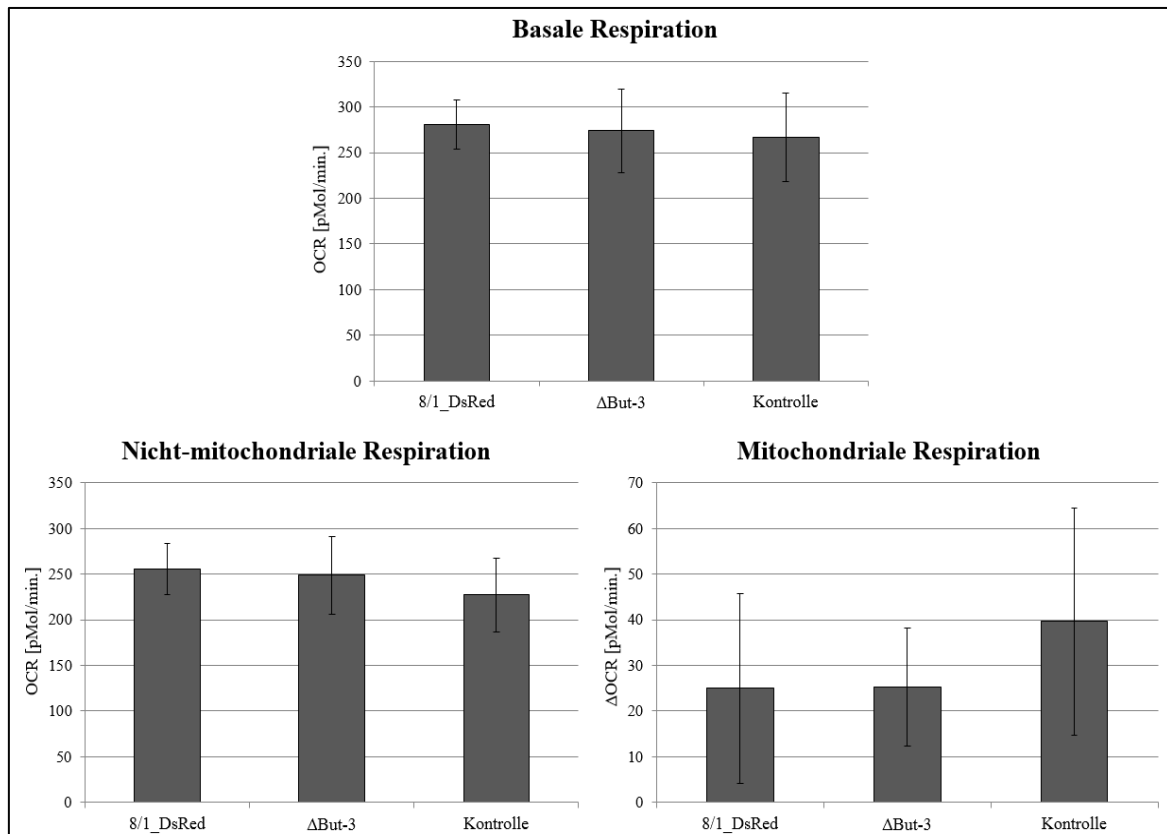


Abb. 30: Vergleich der basalen Respiration von Weizenvorspelzen inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante oder H₂O im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate, 6dpi. Für die Bestimmung der basalen Respiration in infizierten Weizenvorspelzen wurde der OCR-Wert des Messwertes A (vgl. Abb. 29) kurz vor der Zugabe von Oligomycin zum Assay-Medium verwendet. Die basale Respiration setzt sich aus der nicht-mitochondrialen (NMR) und der mitochondrialen Respiration (MR) zusammen. Für die Bestimmung der NMR wurde die OCR des Messpunktes D herangezogen. Durch die Zugabe von Antimycin A und Rotenon wird die MR blockiert. Der verbleibende Sauerstoffverbrauch ist somit auf die NMR zurückzuführen. Die MR wird bestimmt, indem die OCR der NMR von der der basalen Respiration abgezogen wird (Δ OCR, Differenz der Messpunkte A und D). Für jede untersuchte Bedingung wurden 15 biologische Replikate aus min. 3 unabhängigen Experimenten analysiert. Eine Signifikanzanalyse der Gruppen wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm, * $p < 0,05$) durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. 8/1_DsRed und Δ But-3 geben die Stämme an, mit denen Spelzen inokuliert wurden. Die Kontrolle bezieht sich auf Vorspelzen, die mit Wasser inokuliert wurden.

Die Ergebnisse der Abbildung 30 zeigen, dass es keine Unterschiede in der basalen Respiration gibt. Die Unterteilung in NMR und MR ergab, anders als bei Butenolid-behandelten Spelzen (vgl. Abb. 26), ebenfalls keine Unterschiede.

Es folgte die Berechnung der ATP-gekoppelten Respiration. Hierfür wurde wieder die gemessene OCR an Messpunkt B von der ermittelten OCR an Messpunkt A abgezogen. Damit einhergehend wurde ebenfalls wieder überprüft, ob die Protonendurchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran verändert ist (Abb. 31).

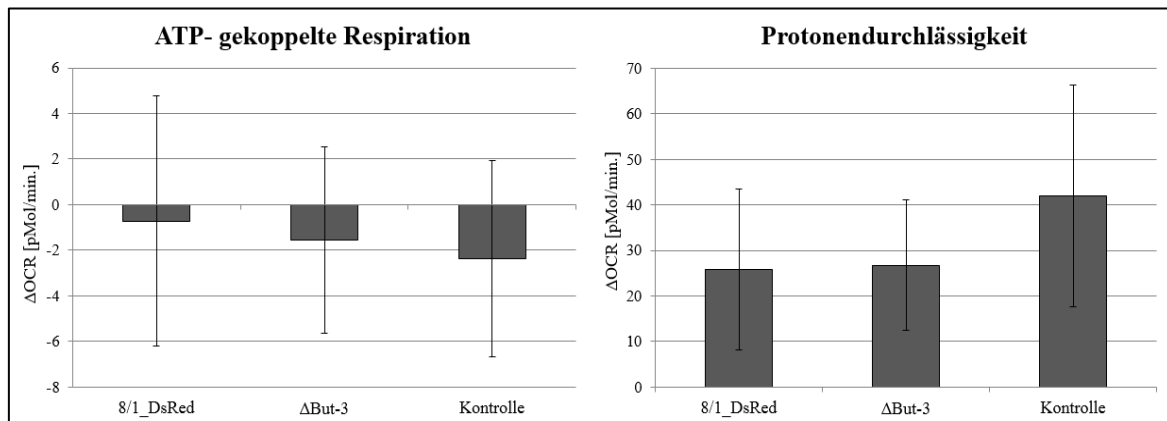


Abb. 31: Vergleich der ATP-gekoppelten Respiration und der Protonendurchlässigkeit von Weizenvorspelzen inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante bzw H_2O im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate, 6dpi. Für die Bestimmung der ATP-gekoppelten Respiration in infizierten Weizenvorspelzen wurde die Differenz der OCR-Werte der Messpunkte A und B gebildet. (Δ OCR; vgl. Abb. 29). Die Zugabe von Oligomycin führt zur Inhibierung der mitochondrialen ATP-Synthase. Der darauffolgende Abfall der OCR gilt als Maß für die ATP-Synthase in den Mitochondrien. Für die Bestimmung der Protonendurchlässigkeit wurde die OCR Differenz der Messpunkte B und D gebildet. Für jede untersuchte Bedingung wurden 15 biologische Replikate aus min. 3 unabhängigen Experimenten analysiert. Eine Signifikanzanalyse der Gruppen wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm, * $p < 0,05$). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. 8/1_DsRed und Δ But-3 geben die Stämme an, mit denen Spelzen inokuliert wurden. Die Kontrolle bezieht sich auf Vorspelzen, die mit Wasser inokuliert wurden.

Die Ergebnisse in Abbildung 31 zeigen für alle Spelzen einen negativen Mittelwert mit großer Standardabweichung für die ATP-gekoppelte Respiration. Es konnte weder ein signifikanter Unterschied zwischen der 8/1_DsRed und der Δ But-3 Infektion, noch zwischen einer Infektion und Wasserinokulation beobachtet werden. Im Vergleich zum vorherigen Experiment mit Butenolid behandelten oder unbehandelten Spelzen ist selbst die ATP-gekoppelte Respiration der Kontrolle deutlich verringert. Dies deutet auf einen generellen Einbruch der ATP-Synthase aller verwendeten Spelzen hin.

Unterschiede in der Protonendurchlässigkeit (Differenz Messpunkt B und D) konnten nicht beobachtet werden.

Die Berechnung für den maximalen Sauerstoffverbrauch wurde ebenfalls durchgeführt. Hierfür wurde die ermittelte OCR an Messpunkt D von der OCR des Messpunktes C abgezogen (vgl. Abb. 29). Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt.

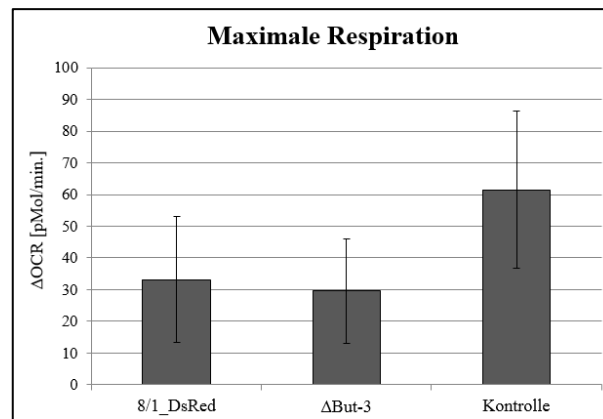


Abb. 32: Vergleich der maximalen Respiration von Weizenvorspelzen inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, der Δ But-3 Mutante bzw. H_2O im Zuge der Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate, 6dpi. Für die Bestimmung der maximalen Respiration in behandelten und unbehandelten Weizenvorspelzen wurde die Differenz der OCR-Werte der Messpunkte C und D gebildet. (Δ OCR; vgl. Abb. 29). Die Zugabe von FCCP führt zum ungehemmten Einstrom an Protonen in die Mitochondrienmatrix. Die Behandlung mit Rotenon und Antimycin hat die Inhibierung der Komplexe I und III zur Folge, wodurch die mitochondriale Atmung vollständig blockiert wird. Für jede untersuchte Bedingung wurden 15 biologische Replikate aus min. 3 unabhängigen Experimenten analysiert. Eine Signifikanzanalyse der Gruppen wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA (ANOVA-Bonferroni-Holm, * $p < 0,05$) durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. 8/1_DsRed und Δ But-3 geben die Stämme an, mit denen Vorspelzen inokuliert wurden. Die Kontrolle bezieht sich auf Vorspelzen, die mit Wasser inokuliert wurden.

Wie auch bei allen anderen betrachteten Aspekten der Atmung konnten keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Respiration zwischen Vorspelzen beobachtet werden, die entweder mit dem 8/1_DsRed Stamm, oder der Δ But-3 Mutante inokuliert wurden.

Der Einfluss von Butenolid während der Infektion konnte hier nicht gezeigt werden. Allerdings ist die ATP-gekoppelte Respiration in den wasser-inokulierten Spelzen im Vergleich zu unbehandelten Spelzen deutlich verringert. Dies deutet darauf hin, dass die für das zweite Experiment verwendeten Spelzen bereits einen generellen Defekt aufwiesen.

3.2.17 Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) -Färbung Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen

Um zu überprüfen, ob die Beeinflussung der Mitochondrien durch Butenolid eine Auswirkung auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) hat, wurden Weizenvorspelzen sowohl in 80 μ g/ml Butenolid, als auch in reinem H_2O für entweder 1 Std. oder 3 Std. inkubiert und anschließend mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) angefärbt. Mit NBT können Superoxid-Anionen (O_2^-) detektiert werden. Es reagiert mit O_2^- , wobei sich ein blaues, unlösliches Präzipitat bildet. Je nach Intensität kann auf eine stärkere oder schwächere Reaktion rückgeschlossen werden. Als weitere Kontrolle dienten Spelzen, die ohne eine Inkubation in H_2O für die Färbung verwendet wurden (Abb. 33-C).

Die Färbung fand mit einer 0,2%igen NBT-Lösung für 45 min statt. Es folgte die Dokumentation der Spelzen an einer Stereolupe. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 gezeigt.

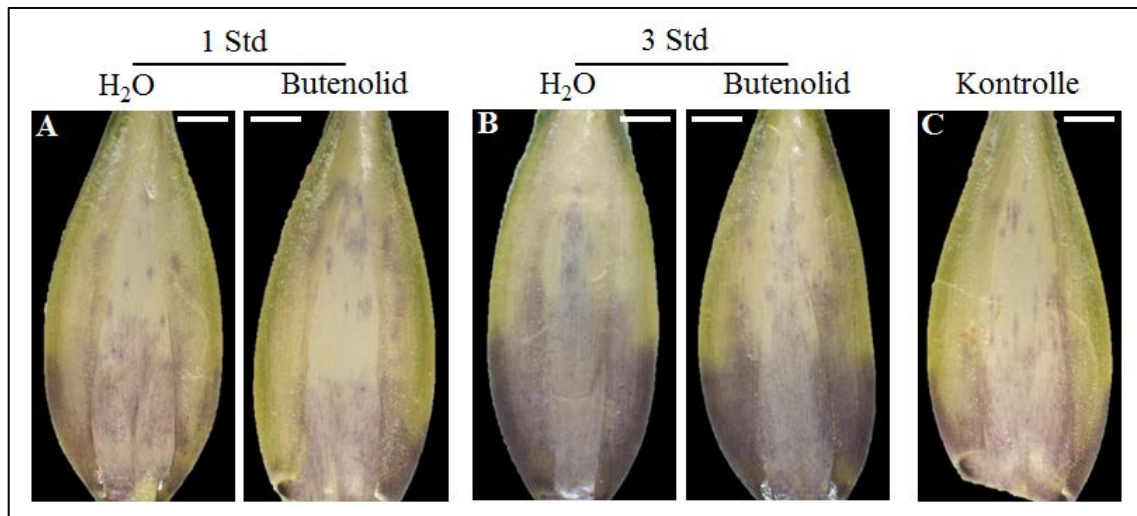


Abb. 33: Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) Färbung von Weizenvorspelzen nach 1- (A) bzw. 3-stündiger (B) Inkubation in Wasser oder in 80 µg/ml Butenolid für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies. Vorspelzen wurden aus Weizenblüten präpariert und entweder in 1 ml sterilem H₂O oder 80 µg/ml Butenolid für 1 Std. (A) oder 3 Std. (B) inkubiert. Es folgte eine 45-minütige NBT-Färbung (0,2%). Außerdem wurde eine Kontrollfärbung direkt nach dem Waschschrift ohne weitere Inkubation durchgeführt (C). Sowohl die Wasser-behandelten, als auch die Butenolid-behandelten Spelzen weisen eine starke Färbung auf. Längenmaß: 2mm. Pro untersuchter Bedingung wurden 6 biologische Replikate verwendet.

Die blaue Verfärbung der Spelzen zeigt, dass die NBT-Färbung funktionierte. Da jedoch sowohl die Kontrollversuche mit Wasser, als auch die Butenolid-behandelten Spelzen NBT-Präzipitate ähnlicher Intensität aufweisen kann kein Unterschied zwischen Butenolid-behandelter und unbehandelter Spelzen beobachtet werden. Es fällt jedoch auf, dass nach einer 3-stündigen Inkubation eine intensivere Färbung zu beobachten war.

3.2.18 Die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid führt in der frühen Infektionsphase zu einer Verringerung der Virulenz von *F. graminearum*

Um zu überprüfen, ob die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid einen Einfluss auf die nachfolgende Infektion von *F. graminearum* hat, wurden zwei Blüten einer Weizenähre mit 10 µl einer 50 ng/ml Butenolid-Lösung vorinokuliert. Nach 24 Std. erfolgte die Inokulation derselben Blüten mit je 200 Konidien des 8/1_DsRed Stammes. Als Kontrolle wurden Weizenblüten mit sterilem ddH₂O vorbehandelt und ebenfalls nach 24 Std. mit Konidien inokuliert. Die Ährenernte erfolgte 5 Tage nach der Konidieninokulation. Nach einer gDNA Isolation des gemörsernten Materials wurde die Menge an Pilz gDNA in dem infizierten Pflanzenmaterial quantifiziert. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung 34 dargestellt.

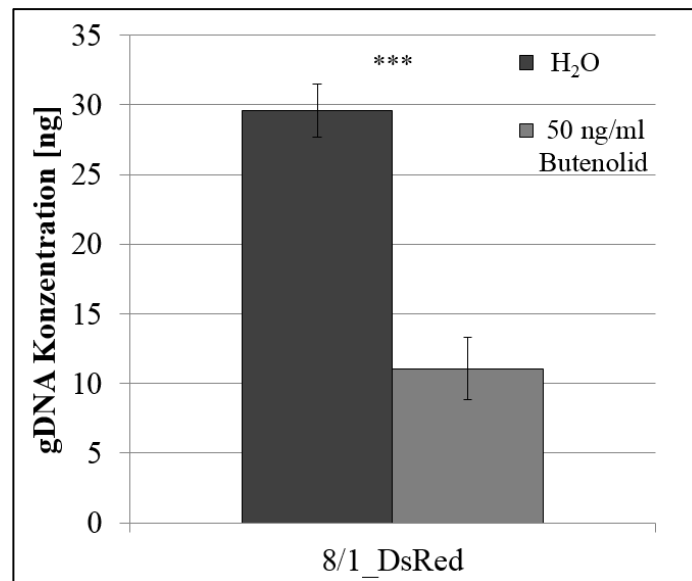


Abb. 34: Vorbehandlung von Weizenblüten mit 0,5 ng Butenolid. Quantifizierung von Pilz gDNA in infiziertem Pflanzenmaterial (5dpi) mittels qRT-PCR. 24 Std. vor der Inokulation zweier Weizenblüten pro Weizenähre mit 200 Konidien des Stammes 8/1_DsRed wurden die Blüten mit 10 µl einer 50 ng/ml Butenolidlösung behandelt. Die Ernte erfolgte 5 Tage nach der Inokulation mit Konidien. Das Pflanze/Pilz-Material wurde für eine gDNA Isolation verwendet. Die Bestimmung der pilzlichen gDNA Konzentration erfolgte mittels qRT-PCR und erhaltener Ct-Werte. Durch die Verwendung einer Standardkurve konnte die gDNA-Menge berechnet werden. Das Experiment wurde mit 3 biologischen und jeweils 3 technischen Replikaten pro Bedingung (H₂O bzw. Butenolid) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test berechnet (**p* < 0,05, ****p* < 0,001).

Die Quantifizierung, dargestellt in Abbildung 34, ergab, dass die Behandlung von Weizenblüten mit 0,5 ng Butenolid vor der Inokulation mit Konidien zu einer Reduzierung der Virulenz während der frühen Phase der Infektion (5 Tage) führt.

3.2.19 Das Sekundärmetabolit Butenolid von *F. graminearum* beeinflusst das Wachstum von Bakterien, Hefen und filamentösen Pilzen *in vitro*

Als weitere Charakterisierung wurde überprüft, ob Butenolid einen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien, Hefen und Pilzen ausübt.

Für den Hemmversuch mit Bakterien und Hefen wurden zunächst über-Nacht Kulturen angezogen, am Folgetag deren OD₅₉₅ bestimmt und mit dem dazugehörigen Medium auf eine OD₅₉₅ = 1 eingestellt. In eine transparente Mikrotiterplatte mit 96-Kavitäten wurden 200 µl der entsprechenden Medien (s. 2.2.2; Tab. 7) vorgelegt und entweder mit 3,2 µl sterilem ddH₂O oder Butenolid (Endkonz. 80 µg/ml) versetzt. Die Inokulation des Mediums erfolgte mit 1 µl der jeweiligen Bakterien- bzw. Hefezellen. Nach 18 Std. Inkubation bei 28 °C bzw. 37 °C wurde über die OD₅₉₅ das Wachstum der getesteten Bakterien und Hefen bestimmt. Die Abbildung 35 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes.

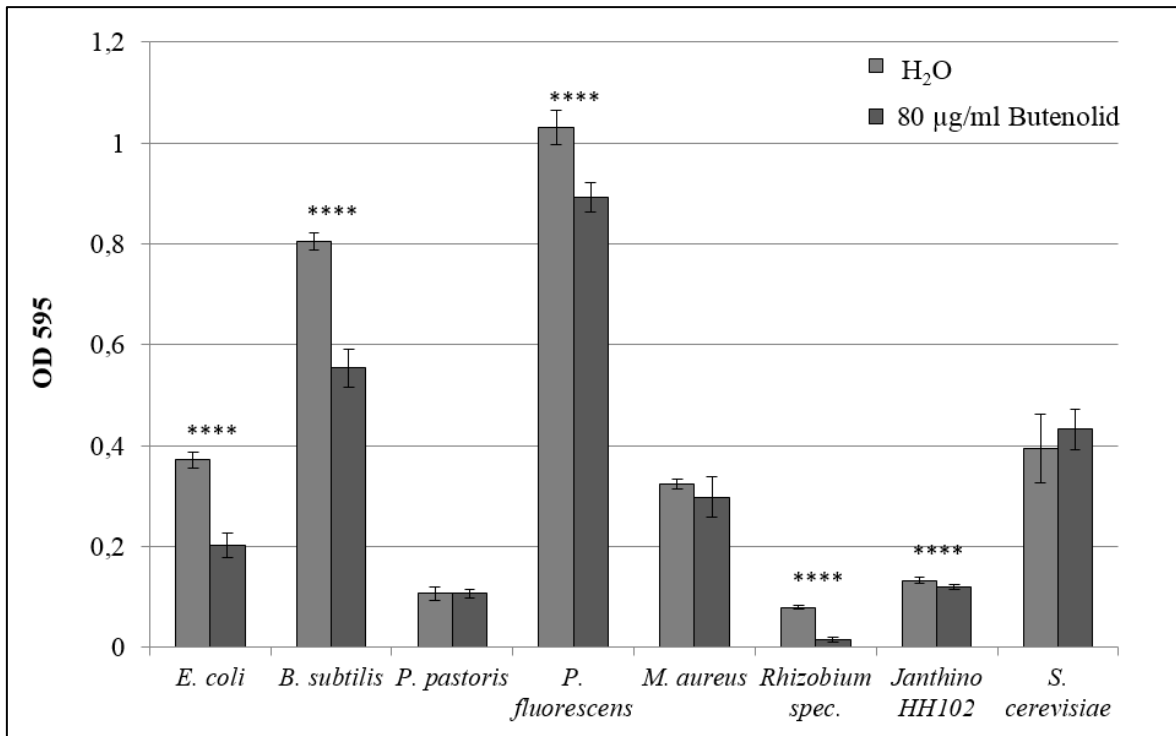


Abb. 35: Wachstumsversuch von Bakterien und Hefen unter Einfluss von Butenolid. Die Bakterien und Hefen wurden zunächst über Nacht im entsprechenden Medium kultiviert, am Folgetag deren OD₅₉₅ bestimmt und auf eine OD₅₉₅ = 1 eingestellt. Eine transparente Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten wurde mit 200 µl Medium/Kavität befüllt und mit 3,2 µl sterilem ddH₂O oder Butenolid (5 mg/ml) versetzt. Nach der Zugabe von 1 µl Bakteriensuspension/Kavität erfolgte eine Inkubation bei 28 °C bzw. 37°C für 18 Std.. Die Messung der OD₅₉₅ der einzelnen Kavitäten wurde mit dem „Mithras2 LB 943“ (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) durchgeführt. Pro verwendeten Bakterien- bzw. Hefestamm wurden 3 biologische und 3 technische Replikate sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Butenolid durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Signifikanzanalyse via einfaktorieller ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm (**** p < 0,0001).

Von den getesteten Gram-positiven Bakterien wies nur das Bakterium *B. subtilis* ein verringertes Wachstum unter Butenolideinfluss auf. Für *M. aureus* konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Anders verhielt es sich mit den untersuchten gram-negativen Bakterien. Hier konnte die stärkste Hemmung bei *E. coli* beobachtet werden. Das Wachstum von *P. fluorescens* sowie *Rhizobium spec.* wurde ebenfalls deutlich durch die Zugabe von Butenolid zum Medium verringert. Für das *Janthino*-Bakterium HH102 wurde nur eine geringe, jedoch signifikante Verringerung festgestellt. Die in diesen Versuch getesteten Hefen *P. pastoris* und *S. cerevisiae* zeigten keine signifikanten Wachstumsunterschiede.

Welche Auswirkung Butenolid auf das Wachstum von *F. graminearum* und andere phytopathogene, filamentöse Pilze hat wurde ebenfalls getestet. Hierfür wurden Konidien verwendet, die bei -70 °C gelagert wurden. Die verwendeten Pilzstämme (2.1.7) exprimierten alle das grün fluoreszierende Protein GFP (engl, **g**reen **f**luorescent **p**rotein). Dadurch konnte das Wachstum anhand der messbaren GFP-Fluoreszenz bestimmt werden. Es wurden 200 µl eines Minimalmediums in einer schwarzen 96-Kavitätenplatte vorgelegt und entweder mit 3,2 µl ddH₂O oder Butenolid (5 mg/ml) versetzt. Das Inokulum bestand

aus 400 Konidien pro Kavität (20 µl, 20 K/µl). Direkt nach der Inokulation (0 Std.) wurde die Ausgangsfluoreszenz gemessen. Nach einer Inkubation von 24 bzw. 48 Std. bei 28 °C wurde die GFP Fluoreszenz erneut gemessen und die Fluoreszenzwerte des 0 Std. Zeitpunktes abgezogen. Somit konnte die Fluoreszenzzunahme ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 36 dargestellt.

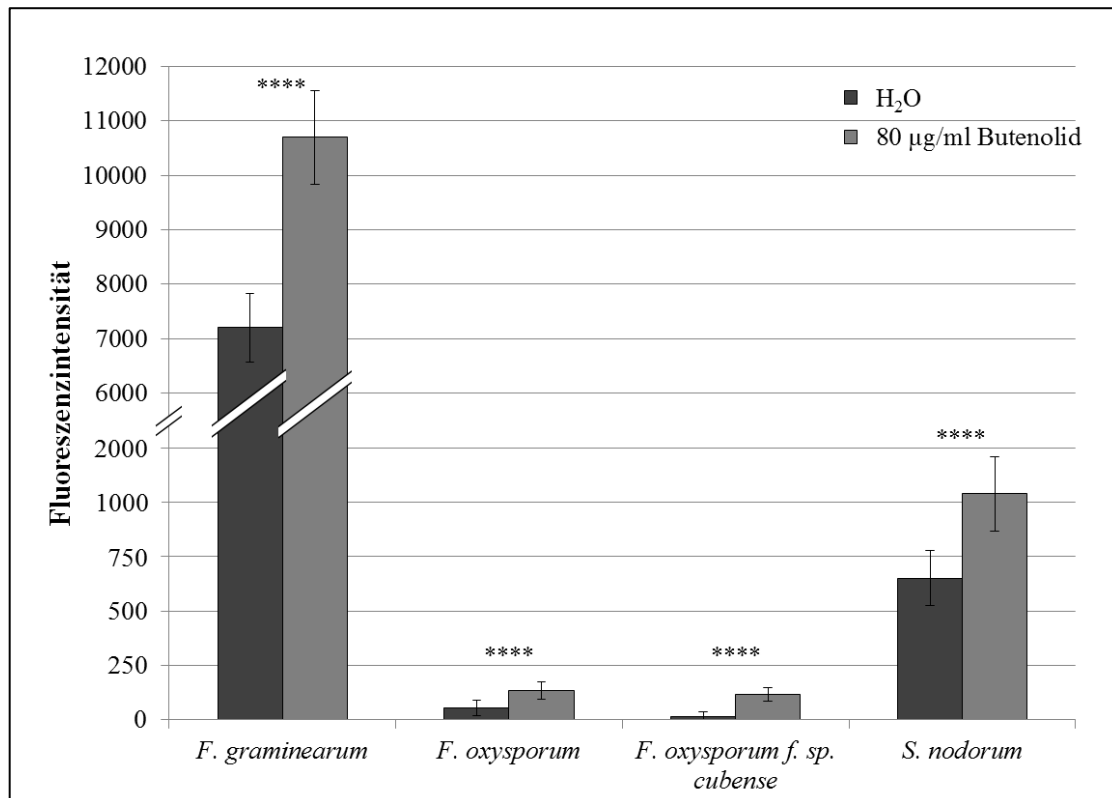


Abb. 36: Wachstumsversuch von phytopathogenen Pilzen unter Einfluss von Butenolid, 24 hpi. Eine schwarze Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten wurde mit 200µl Minimalmedium/Kavität befüllt und mit 3,2 µl sterilem ddH₂O oder Butenolid (5 mg/ml; Endkonz. 80 µg/ml) versetzt. Nach der Zugabe von 400 Konidien/Kavität/Pilz erfolgte eine Inkubation bei 28 °C für 24 Std.. Die Fluoreszenzmessung der einzelnen Kavitäten wurde mit Hilfe des „Mithras2 LB 943“ (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) unter Verwendung folgender Filtersysteme durchgeführt: Anregung: 460(x10) nm, Emission: 520(x10) nm. Pro verwendeten Pilzstamm wurden 5 biologische und 3 technische Replikate sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Butenolid durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Signifikanzanalyse via einfaktorieller ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm (**** p < 0,0001).

Betrachtet man zunächst nur die Fluoreszenzintensitäten unabhängig von der Butenolidzugabe fällt auf, dass *F. graminearum* die höchsten Werte nach 24-stündiger Inkubation aufweist.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl für *F. graminearum*, als auch für *F. oxysporum f. sp. cubense* ein signifikanter Unterschied zwischen Wachstum im Minimalmedium und Wachstum unter Butenolideinfluss besteht. Die Zugabe von 80 µg/ml Butenolid führte für beide Pilze zu einem verstärkten Wachstum. *F. oxysporum* und *S. nodorum* wiesen nach 24 Std. ebenfalls signifikante Unterschiede auf. Es konnte ein verstärktes Wachstum in Minimalmedium mit Butenolid beobachtet werden.

Da die Fluoreszenzwerte zum Teil sehr gering waren wurden diese nach weiteren 24 Std. (insgesamt 48 Std.) Inkubation nochmals gemessen (s. Abb. 37).

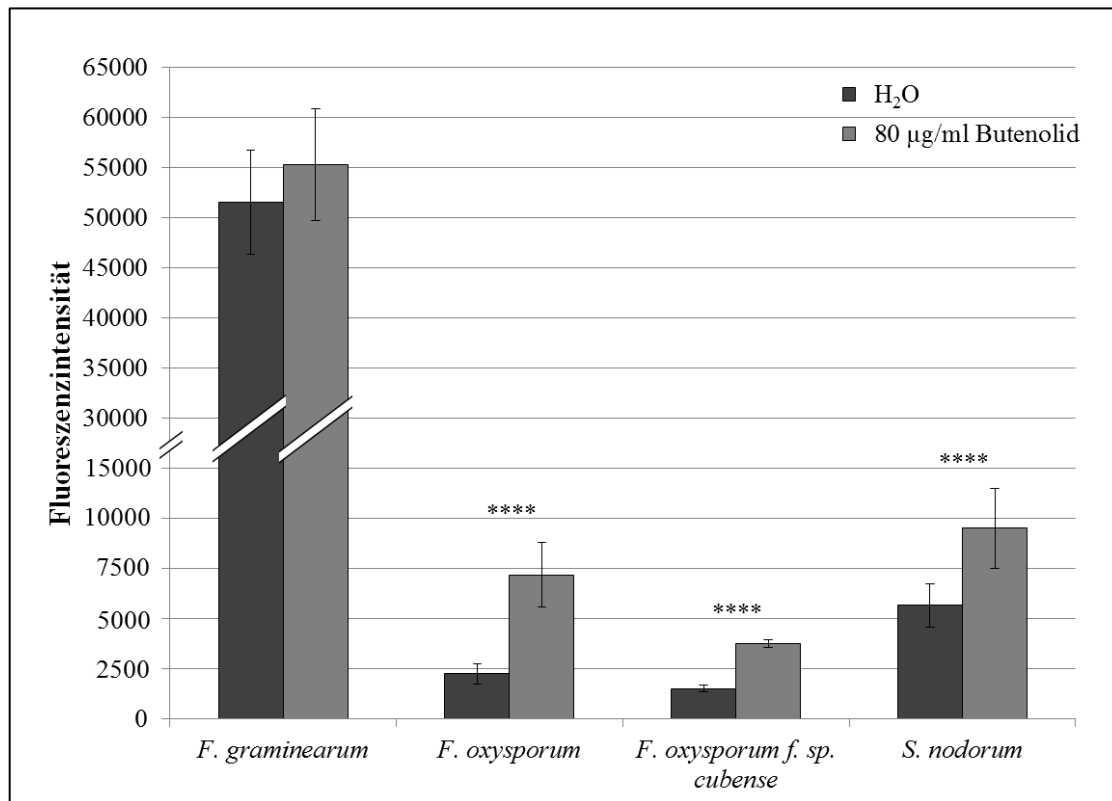


Abb. 37: Wachstumsversuch von phytopathogenen Pilzen unter Einfluss von Butenolid, 48 hpi. Eine schwarze Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten wurde mit 200µl Minimalmedium/Kavität befüllt und mit 3,2 µl sterilem ddH₂O oder Butenolid (5 mg/ml; Endkonz. 80 µg/ml) versetzt. Nach der Zugabe von 400 Konidien/Kavität/Pilz erfolgte eine Inkubation bei 28 °C für 48 Std. Die Fluoreszenzmessung der einzelnen Kavitäten wurde mit Hilfe des „Mithras2 LB 943“ (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) unter Verwendung folgender Filtersysteme durchgeführt: Anregung: 460(x10) nm, Emission: 520(x10) nm. Pro verwendeten Pilzstamm wurden 5 biologische und 3 technische Replikate sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Butenolid durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Signifikanzanalyse via einfaktorieller ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm (**** p < 0,0001).

Die zuvor beobachteten Unterschiede bei *F. graminearum* sind nach weiteren 24 Std. Wachstum nicht mehr vorhanden. Die Messungen zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied mehr gibt. Anders verhält es sich mit *F. oxysporum*, *F. oxysporum f. sp. cubense* und *S. nodorum*. Bei allen drei Pilzen konnte sowohl nach 24 Std., als auch nach 48 stündiger Inkubation ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im Vergleich zum reinen Minimalmedium zeigten alle ein erhöhtes Wachstum, wenn mit Butenolid versetztes Medium verwendet wurde.

Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich Butenolid sowohl auf das Wachstum von *F. graminearum*, als auch auf das anderer phytopathogener Pilze positiv auswirkt. Es konnte für alle ein erhöhtes Wachstum unter Butenolideinfluss nachgewiesen werden.

3.2.20 Die Regeneration von Protoplasten des 8/1_DsRed Stammes ist unter Einfluss von Butenolid verändert

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass synthetisches Butenolid in einer Konzentration von 80 µg/ml das *in vitro* Wachstum von Bakterien, Hefen und filamentösen Pilzen beeinflusst. Eine Gemeinsamkeit dieser Organismen ist das Vorhandensein einer Zellwand. Wie das Butenolid auf Zellwand-freie Zellen wirkt wurde in einem nächsten Schritt untersucht.

Hierfür wurden Protoplasten aus frisch kultiviertem Myzel des 8/1_DsRed Stammes von *F. graminearum* hergestellt (2.2.6), ausgezählt und auf $5 \cdot 10^4$ Protoplasten/ml eingestellt. Nach der Regeneration der Protoplasten in TB3-Puffer mit einer Konzentration von 80 µg/ml Butenolid bzw. ohne Butenolid-Zugabe, wurden 5.000 bzw. 15.000 Protoplasten zu 50 ml TB3-Agar gegeben, vermischt und auf 5 Petrischalen á 10 ml aufgeteilt. Pro Petrischale und verwendeter 10 ml wurden so jeweils ca. 1.000 bzw. 3.000 Protoplasten ausplattiert. Am Folgetag wurden die Platten dokumentiert und erhaltene Kolonien ausgezählt (Abb. 38).

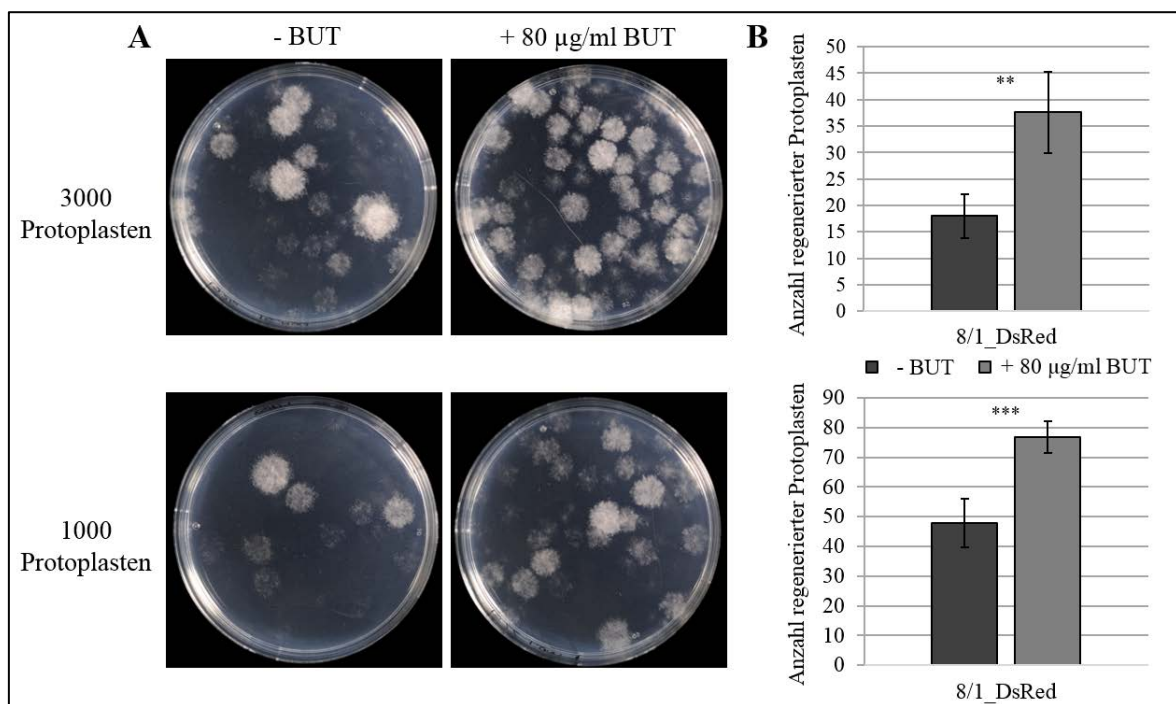


Abb. 38: Untersuchung zur Regeneration von *F. graminearum* Protoplasten unter Butenolideinfluss. Myzel des 8/1_DsRed Stammes wurde protoplastiert und die Protoplasten-Konzentration auf $5 \cdot 10^4$ Protoplasten/ml eingestellt. Die Regeneration der Protoplasten erfolgte über Nacht in TB3-Puffer versetzt mit Butenolid (Endkonz. 80 µg/ml) bzw. TB-3 Puffer. Am Folgetag wurden 5.000 bzw. 15.000 Protoplasten in 50 ml TB3-Agar gegeben, vermischt und auf 5 Petrischalen á 10 ml verteilt, sodass ca. 1.000 bzw. 3.000 Protoplasten ausplattiert wurden. Am Folgetag wurden die Platten dokumentiert (A) und erhaltene Kolonien ausgezählt (B). Pro untersuchter Bedingung (80 µg/ml BUT; - BUT) wurden 5 Platten ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung bezogen auf alle ausgewerteten Platten. Es wurden Mittelwerte erstellt und die Signifikanz mittels Student's *t*-Test berechnet (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Wie in der Abbildung 38-A ersichtlich, können mehr gewachsene Kolonien beobachtet werden, wenn die Protoplastenregeneration mit 80 µg/ml Butenolid stattgefunden hat. Dies ist unabhängig von der eingesetzten Zahl an Protoplasten (Pp). Die Zählung erhaltener Kolonien mit anschließender Signifikanzanalyse (Student's *t*-Test), dargestellt in Abbildung 38-B, hat ergeben, dass die Zunahme an erhaltenen Kolonien durch die Regeneration in 80 µg/ml Butenolid signifikant zur Kontrolle ohne Butenolidzugabe ist. Somit wirkt sich Butenolid nicht nur positiv auf das Wachstum phytopathogener Pilze, sondern auch auf die Regeneration von pilzlichen Protoplasten aus.

3.2.21 Das Polyketid Aurofusarin hat keinen Einfluss auf das Wachstum gram-negativer Bakterien

Die vorherigen Versuche mit synthetischem Butenolid haben gezeigt, dass sich sowohl gram-negative, als auch gram-positive Bakterien im Wachstum inhibieren lassen, wenn dem Medium Butenolid hinzugegeben wurde. Die getesteten Phytopathogene allerdings wiesen dagegen ein verstärktes Wachstum unter Butenolideinfluss auf.

Ein weiteres Sekundärmetabolit, das von *F. graminearum* produziert wird, ist Aurofusarin. Hierbei handelt es sich um ein rotes Pigment, das zur Gruppe der Polyketide gehört. Die Deletion der Polyketidsynthase 12 (FgPKS12) führt zu Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, dieses Pigment zu synthetisieren. Dies äußert sich im Wachstum weißer Kolonien (Malz et al. 2005).

Im Rahmen der Doktorarbeit von Sascha Malz (2004; AG Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg) wurden bereits mehrere gram-negative und gram-positive Bakterien, Hefen und weitere phytopathogene Pilze dahingehend überprüft, ob Aurofusarin deren Wachstum *in vitro* inhibieren kann. Dabei konnte ein klarer Unterschied zwischen den gram-negativen und gram-positiven Bakterien beobachtet werden: Während die gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* nicht im Wachstum eingeschränkt wurden, wurden *B. subtilis* und *Micrococcus luteus* als gram-positive Bakterien fast vollständig inhibiert. Anders als beim Butenolid scheint sich die Wirkung von Aurofusarin also auf gram-positive Bakterien zu beschränken. Um zu überprüfen, ob sich weitere gram-negative Bakterien ebenfalls nicht durch Aurofusarin inhibieren lassen, wurde dies innerhalb eines Wachstumsversuches untersucht. Hierfür wurden die Bakterien *P. fluorescens* sowie *Rhizobium spec.* und *Janthino*-Bakterium HH102 verwendet.

Für die Extraktion von Aurofusarin wurde 3 Tage kultiviertes Myzel des 8/1_DsRed Stammes mit Kaliumphosphatpuffer versetzt, der Zellaufschluss mit Metallkugeln und einer Schwingmühle bewerkstelligt. Nachdem Zellreste abzentrifugiert worden sind wurde der Überstand sterilfiltriert und konnte anschließend für die Wachstumsversuche verwendet werden. Als Kontrolle wurden zum einen Extrakte einer Aurofusarin-defizienten Mutante hergestellt und verwendet. Die zweite Kontrolle war der verwendete Puffer. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der Abbildung 39 dargestellt.

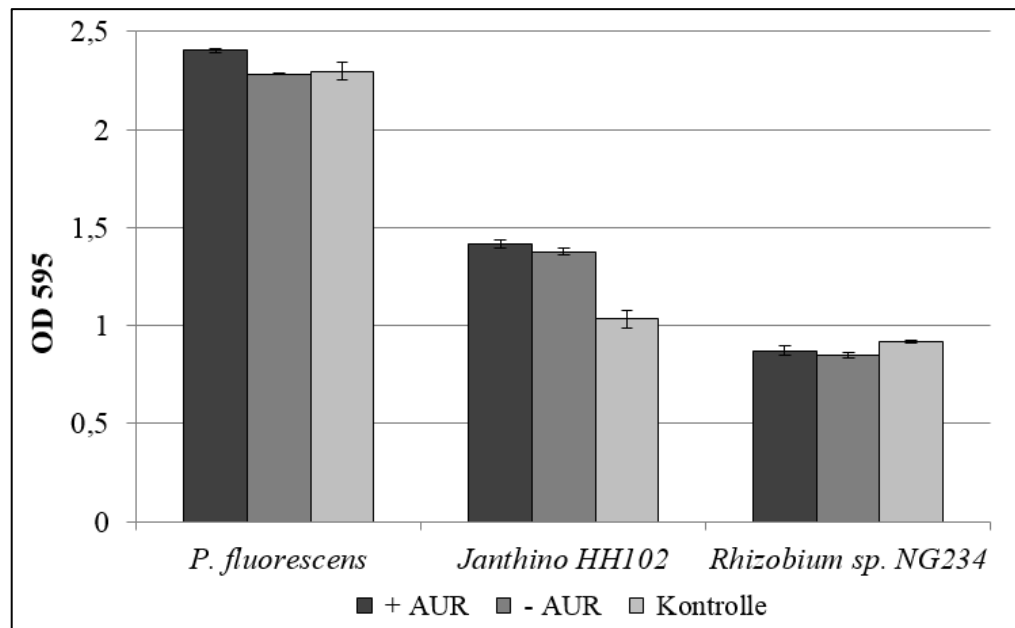


Abb. 39: Bestimmung des Wachstums gram-negativer Bakterien unter Einfluss von Aurofusarin-enthaltenen Extrakten. Es wurden Extrakte des 8/1_DsRed Stammes (+AUR) und einer Aurofusarin-defizienten Mutante (-AUR) mit einem Kaliumphosphatpuffer erstellt und somit das Pigment Aurofusarin extrahiert. Bakterienkulturen wurden mit dem jeweiligen Extrakt bzw. dem Puffer versetzt und für 16 Std. inkubiert. Am Folgetag wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Es wurden 3 biologische Replikate mit jeweils 3 technischen Replikaten erstellt.

Es zeigte sich, dass die getesteten Bakterien *P. fluorescens*, *Rhizobium spec.* und *Janthino*-Bakterium HH102 keine Reduktion im Wachstum durch die Zugabe des Wildtyp-Extrakts mit Aurofusarin aufweisen. Dieses Ergebnis zusammen mit vorherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass gram-negative Bakterien nicht durch das Polyketid Aurofusarin, jedoch durch die Zugabe von Butenolid, inhibiert werden können.

3.2.22 Fazit: Sekundärmetabolite sind ein entscheidender Faktor während der Infektion von Weizen durch *F. graminearum*

Die in den vorherigen Kapiteln erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Sekundärmetabolite während der Infektion von *F. graminearum* eine Rolle spielen. Das erste in dieser Arbeit analysierte Metabolit, das Mykotoxin DON, hat einen entscheidenden Einfluss auf die frühe Phase der Infektion. DON defiziente Mutanten waren nicht in der Lage, inokulierte Weizenblüten in dem Maße nach fünf Tagen zu kolonisieren, wie es der Referenzstamm tat. Es konnte eine deutliche Reduktion der Virulenz beobachtet werden.

Weiterhin wurde das Sekundärmetabolit Butenolid näher betrachtet. Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren dieses zu synthetisieren, zeigten eine Erhöhung der Virulenz. Die Kolonisierung über den Rachisknoten hinaus wurde im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm schneller vollzogen. Dieser Phänotyp konnte sowohl genetisch, als auch chemisch komplementiert werden. DON spielt hier keine entscheidende Rolle, da die Deletionsmutanten ähnliche DON-Konzentrationen akkumulierten wie der 8/1_DsRed

Stamm. Die Virulenz des Referenzstammes konnte durch die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid reduziert werden.

Die vermehrte Synthese von Butenolid durch die erhöhte Expression des Cytochrom P450 Proteins FGSG_08079 konnte nicht beobachtet werden. Sie wirkte sich jedoch auf die Regulation des Genclusters aus. Fast alle Clustergene waren im Vergleich zum Referenzstamm runterreguliert. Dass DON hier keine Rolle spielt wurde ebenfalls nachgewiesen.

Neben dem Einfluss während der Infektion wurde auch überprüft, wie Butenolid auf andere Organismen wirkt. Unter Butenolideinfluss konnten gram-negative und gram-positive Bakterien im Wachstum gehemmt werden. Anders verhielt es sich mit phytopathogenen Pilzen. Diese erfuhren durch die Zugabe von Butenolid eine Wachstumszunahme. Auch die Regenerationsrate von *F. graminearum* Protoplasten war nach einer Behandlung mit Butenolid deutlich erhöht.

Bei der Untersuchung antimikrobieller Eigenschaften verbleibend, wurde zuletzt gezeigt, dass das Polyketid Aurofusarin keine Auswirkungen auf das Wachstum gram-negativer Bakterien hat.

3.3 Analysen zur Bedeutung der Cerato-platanin Proteine FgCPP1 und FgCPP2 für die Infektion von Weizen durch *F. graminearum*

3.3.1 *In silico* Analyse und Vergleich von Cerato-platanin Proteinen diverser Pilze

Cerato-platanin ist ein Cystein-reiches Protein aus *Ceratocystis platani* mit phytotoxischen Eigenschaften (Pazzagli et al., 1999). Cerato-platanine sind kleine, mäßig hydrophobe Proteine mit einer Proteinelänge von 120 bis 140 Aminosäuren. Sie besitzen eine Cerato-platanin Domäne und vier konservierte Cystein-Reste (Pazzagli et al., 2014). Die Deletion homologer Proteine in *M. oryzae* und *B. cinerea* führten zu einer Reduktion der Virulenz (Jeong et al, 2007; Frías et al, 2011).

Das Genom von *F. graminearum* besitzt fünf Gene mit möglicher Cerato-platanin Domäne. Um herauszufinden, welche dieser fünf Gene die größte Homologie zu den bereits beschriebenen und charakterisierten CPPs besaßen, und, welche als Kandidaten für eine eingehende Charakterisierung in Frage kommen, wurde die Aminosäuresequenz aller fünf *F. graminearum* CPPs mit denen anderer Ascomyceten verglichen. Das Alignment aller Sequenzen und die Sequenzhomologie wurde mit der ClustalX(2.1) Software durchgeführt und konservierte Regionen mittels GeneDoc bestimmt. Das Ergebnis des Alignments ist in der Abbildung 40 dargestellt.

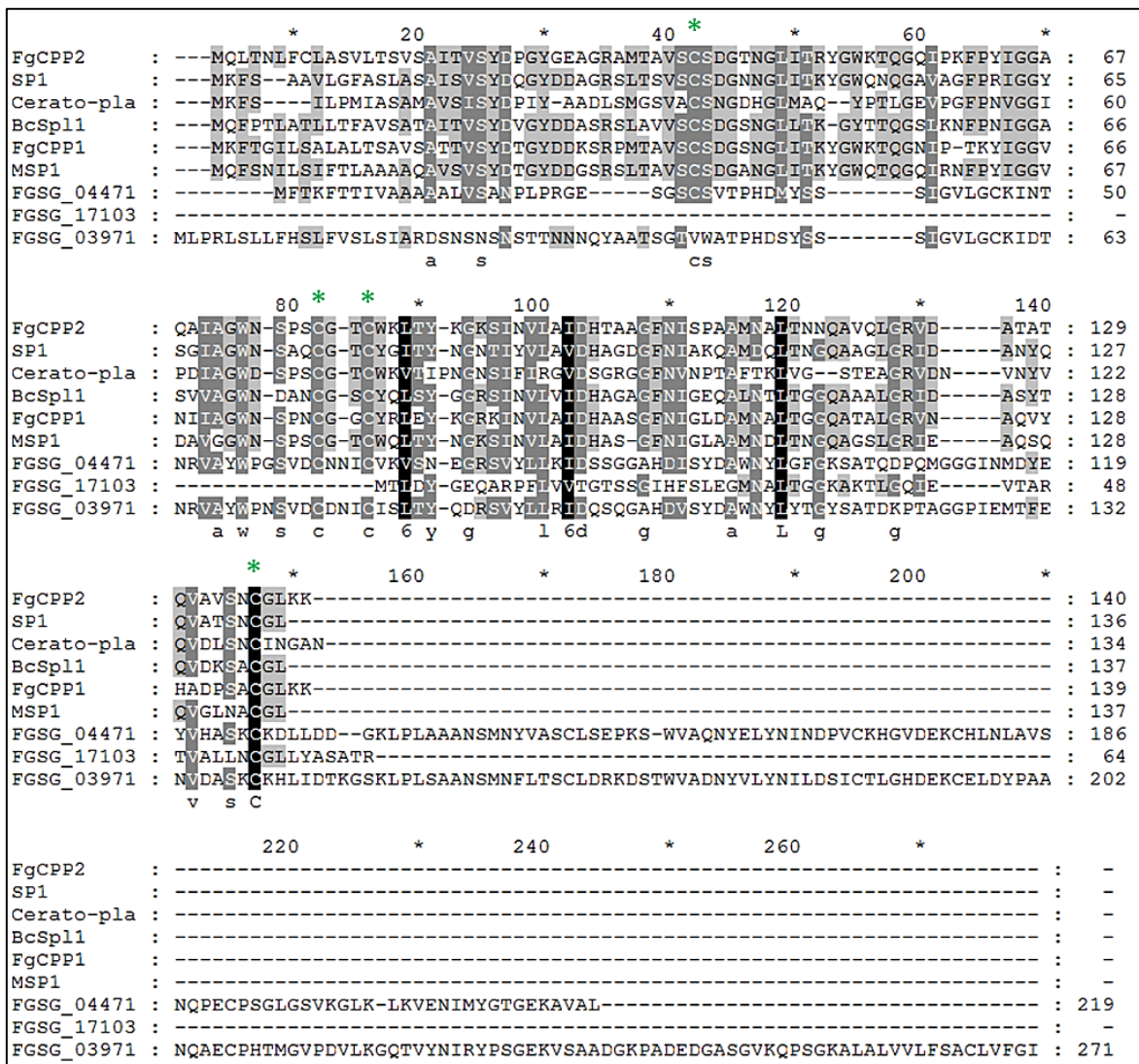


Abb. 40: Alignment von Aminosäuresequenzen pilzlicher Cerato-platanin Protein-Homologe. Das Alignment der Aminosäuresequenzen homologer Cerato-platanin und SnodProt Proteinen wurde mit der Software ClustalX(2.1) durchgeführt. Die Analyse konservierter Regionen fand unter Verwendung von geneDoc statt. Grüne Sterne markieren konservierte Cysteine.

Das Alignment in Abbildung 40 zeigt, dass sowohl in beiden FgCPP Proteinen, als auch in den homologen Proteinen von *S. nodorum* (SP1), *C. fimbriata f. sp. platani* (Cerato-pla), *B. cinerea* (BcSpl1) und *M. oryzae* (MSP1) vier konservierte Cysteine vorliegen (Abb. 40, grüne Sterne). FGSG_04471 weist diese zwar ebenfalls auf, besitzt aber noch ein fünftes Cystein. Die Aminosäuresequenz von FGSG_17103 enthält nur eines der vier konservierten Cysteine, während FGSG_03971 drei konservierte und sechs zusätzliche besitzt.

Betrachtet man sich die Sequenzhomologien, so zeigen FgCPP1 und FgCPP2 eine 61%ige Übereinstimmung. Vergleicht man nun die Sequenzen dieser beiden Proteine mit denen der anderen Ascomyceten so konnte für FgCPP1 und FgCPP2 eine Homologie von 61-62% zu Msp1, 55-56% zu BcSpl1, 53-55% zu SP1 und 32-39% zu Cerato-Platanin bestimmt werden. Für die anderen möglichen *F. graminearum* CPPs (FGSG_04471, FGSG_17103, FGSG_03971) konnten lediglich Homologien von 8-15% ermittelt werden. Ebenso verhält

es sich mit der Sequenzidentität dieser drei möglichen CPPs im Vergleich mit denen der anderen Ascomyceten.

Die Sequenzanalysen haben demnach gezeigt, dass FgCPP1 und FgCPP2 die größte Ähnlichkeit zu den bisher charakterisierten Cerato-platanin Proteinen besitzen.

Für die weitere Charakterisierung der Proteinsequenzen wurden diese hingehend auftretender Domänen untersucht. Hierfür wurde sowohl das Online-Tool „SMART“ als auch „MotifScan“ verwendet. Die Ergebnisse sind schematisch in der Abbildung 41 dargestellt.

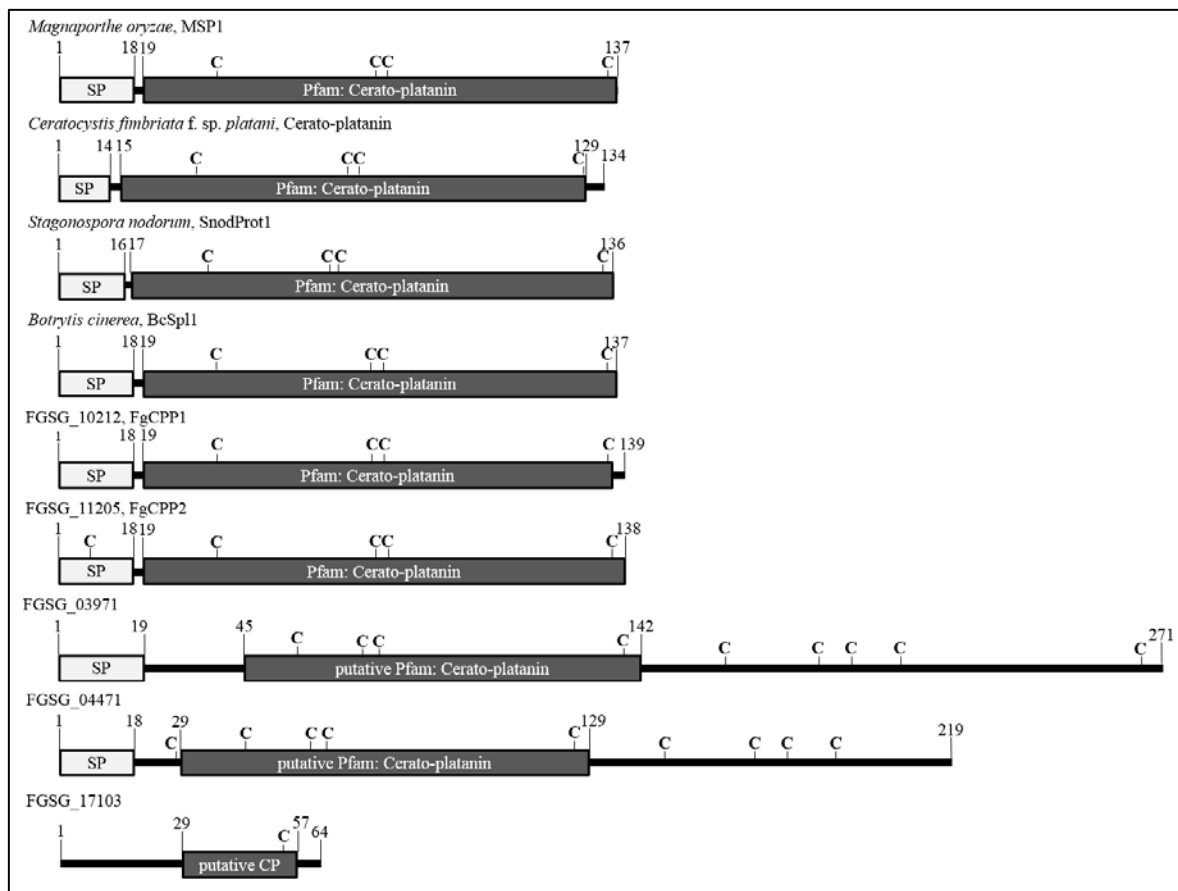


Abb. 41: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cerato-Platanin Proteinen (CPP) unterschiedlicher Pilze. Die Bestimmung von Signalpeptiden (SP) und konservierter Cerato-Platanin Domänen wurde mit dem „SMART analysis tool“ (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) und dem Online-Tool „MotifScan“ (MyHits, SIB, Switzerland; http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) durchgeführt. Alle Cystein-Reste sind durch ein „C“ angegeben. Die Zahlen stehen für die Position innerhalb der Aminosäuresequenz und zeigen den Beginn und das Ende vorhergesagter Domänen. Folgende Proteine wurden analysiert: *F. graminearum* FGSG_10212 (FgCPP1); *F. graminearum* FGSG_11205 (FgCPP2); *F. graminearum* FGSG_03971; *F. graminearum* FGSG_04471; *F. graminearum* FGSG_17103; *S. nodorum* SnodProt1 (SP1, AAC26870.1); *Ceratocystis platani* Cerato-platanin (Cerato-pla, CAC84090.2); *M. oryzae* SnodProt1 (MSP1, XP_003710181.1); *B. cinerea* SnodProt-like1 (BcSpl1, XP_001559499.1). Die jeweiligen Accession-numbers wurden von der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bezogen.

Die Vorhersage der Proteindomänen zeigte für alle analysierten Proteine eine mögliche Cerato-platanin Domäne an. Es konnte außerdem für alle, mit Ausnahme von FGSG_17103, ein Signalpeptid bestimmt werden. Es fällt auf, dass sich die FgCPP aus *F. graminearum* im Aufbau und der Länge der Domänen kaum unterscheiden. Betrachtet man sich nun die drei anderen CPP (FGSG_03971, FGSG_04471, FGSG_17103) so kann ein deutlicher Unterschied zwischen ihnen und der anderen Proteine beobachtet werden.

Die Proteinsequenz von FGSG_03971 besteht aus 271, die von FGSG_04471 aus 219 Aminosäuren. Dies entspricht nicht der typischen Proteinslänge beschriebener CPP von ca. 140 Aminosäuren. Gleiches gilt für FGSG_17103 (64 Aminosäuren).

Die hier durchgeführten *in silico* Analysen der putativen CPP in *F. graminearum* und die Vergleiche mit bereits bekannten Cerato-platanin Proteinen haben gezeigt, dass für die Proteine FgCPP1 und FgCPP2 die größte Ähnlichkeit zu eben jenen besteht.

Die u.a. beschriebene Rolle der CPPs als Virulenzfaktoren während der Infektion von *M. oryzae* und *B. cinerea* machen FgCPP1 und FgCPP2 zu interessanten Kandidaten für eine genauere Analyse dieser Proteine während der Infektion von Weizen durch *F. graminearum*.

3.3.2 Generierung von Einzel- und Doppel-Deletionsmutanten für FgCPP1 (FGSG_10212) und FgCPP_{1,2} (FGSG_10212, FGSG_11205)

Die *in silico* Analysen zuvor haben gezeigt, dass die Cerato-platanin Gene FgCPP1 und FgCPP2 die größte Homologie zu bereits beschriebenen CPPs besitzen. Da diese in anderen Pilzen auch für die Virulenz wichtig sind sollte überprüft werden, welche Rolle FgCPP1 und FgCPP2 während der Infektion von Weizen einnehmen.

Hierfür wurden zunächst Deletionsmutanten des Gens FgCPP1 (Δ FgCPP1) erstellt. Die Klonierung des Deletionsplasmids fand unter Verwendung des Heferekombinationssystems statt. Das Deletionsplasmid wurde anschließend in Protoplasten des Stammes 8/1_DsRed transformiert. Die Integration des Konstruktes fand mittels doppeltem Crossing-over statt. Dies wurde durch Sequenzen innerhalb des Konstruktes ermöglicht, die homolog zu den Bereichen zuseiten der FgCPP1 Sequenz waren. Die auszuschaltende Gensequenz wurde somit durch die der Hygromycin-Resistenzkassette (HygB) ersetzt (s. Abb. 42-A). Diese diente der Selektion von Transformanten.

Die Überprüfung einer erfolgreichen Deletion des FgCPP1 Gens erfolgte zunächst via PCR mit gen-internen Primern (Abb. 42-B, schwarze Pfeile). Wurde die Gensequenz von FgCPP1 durch die Hygromycin-Resistenzkassette (HygB) ersetzt können die Primer nicht binden. Folgerichtig kann kein Produkt amplifiziert werden. Die Transformation ergab 30 Transformanten. Von diesen konnte nur eine Transformante als Deletionsmutante identifiziert werden (Abb. 42-B).

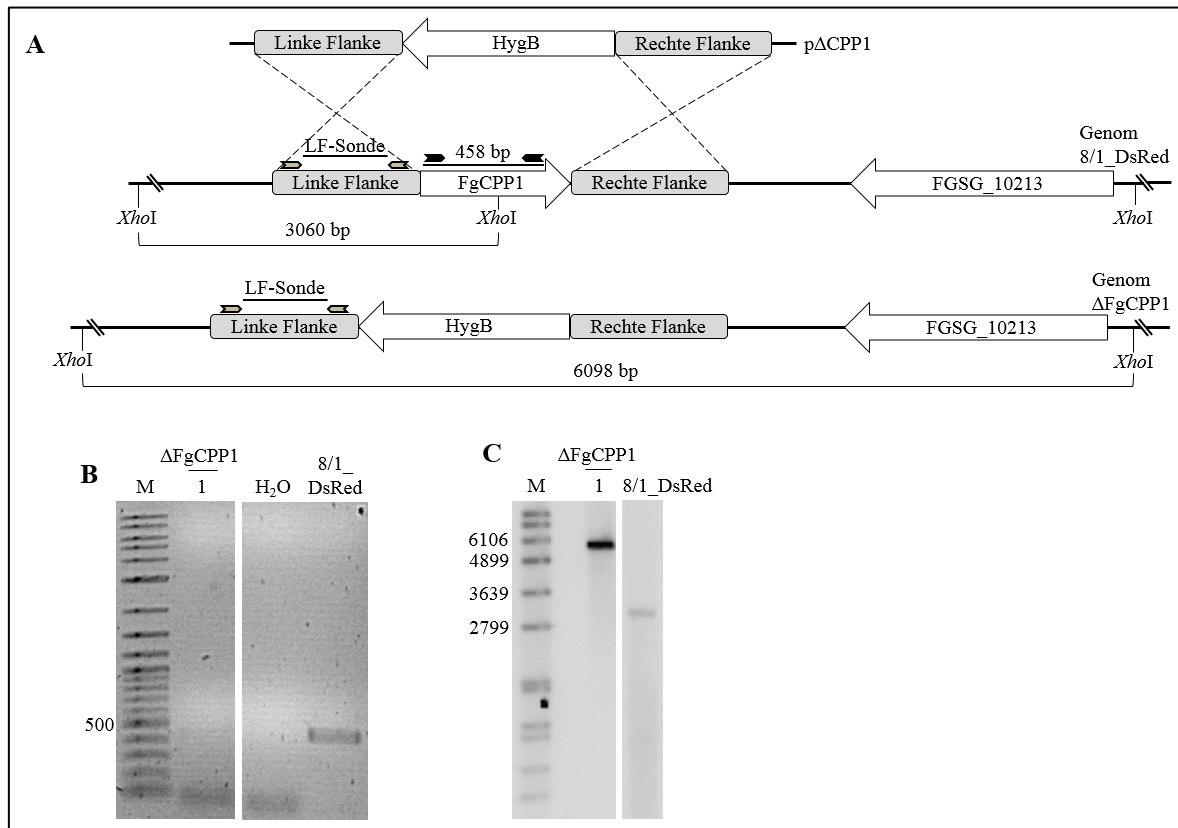


Abb. 42: Schematische Darstellung der Generierung von Deletionsmutanten des Gens FgCPP1 (FGSG_10212) mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen Deletion. **A** Schematische Darstellung der homologen Rekombination im Genlokus von FGSG_10212. Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte in den Vektor pRS426 (Christianson et al., 1992) mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Es erfolgte eine homologe Integration des Deletionskonstrukts in das *F. graminearum*-Genom 8/1_DsRed durch ein doppeltes Crossing-over. Die Hygromycin-Resistenzkassette (HygB) diente zur Selektion der Transformanten. **B** PCR-Nachweis der homologen Rekombination des Deletionskonstruktes in den nativen FGSG_10212 Lokus in erhaltenen Transformanten. Dazu wurden die Primer AG1_Int_FgSP1_fw und AG2_Int_FgSP1_rev (siehe A: schwarze Pfeilspitzen, Primersequenzen in 2.1.3, Tab. 2) generiert. Die Abwesenheit des PCR-Fragmentes in der ΔFgCPP1 Mutante (ΔFgCPP1: 0 bp, 8/1_DsRed: 458 bp) beweisen die Integration des Deletionskonstruktes in den nativen Genlokus. **C** Southern Blot Analyse von Transformanten, die in der PCR eine Deletion des FGSG_10212 Gens zeigten. Hierfür wurde die mit XhoI-restringierte genomische DNA von 8/1_DsRed und der ΔFgCPP1 Mutante 1 mit einer Sonde für die linke Flanke (LF-Sonde, siehe A) hybridisiert. In der ΔFgCPP1 Mutante 1 konnte eine Bande von 6098 bp detektiert werden. 8/1_DsRed weist ein Signal bei 3060 bp auf. Marker (M) B: Gene Ruler 1kb Plus (Thermo Scientific), Marker C: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG labeled (Roche).

Die PCR Überprüfung mit gen-internen Primern hat für den 8/1_DsRed Stamm eine Bande von 458 bp ergeben. Die Transformante ΔFgCPP1-1 zeigt kein Fragment. Die Verifizierung der Deletion von ΔFgCPP1-1 wurde mit einem Southern Blot durchgeführt (Abb. 42-C). Mit einer Sonde für den linken flankierenden Bereich sollte für die Mutante ein Fragment von 6098 bp detektiert werden, während das Vorhandensein der FgCPP1 Sequenz zu einem Fragment von 3060 bp führt. Wie in der Abbildung 42-C zu sehen ist, wurden diese Fragmente nachgewiesen. Die Deletion von FgCPP1 war erfolgreich und konnte sowohl durch PCR als auch via Southern Blot nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, dass bei einer Deletion von FgCPP1 dessen Funktionen von FgCPP2 übernommen werden, wurde letzteres in der Δ FgCPP1-1 Mutante ausgeschaltet und somit Doppel-Deletionsmutanten generiert ($\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2}).

Das verwendete Plasmid p Δ FgCPP2 besaß als Resistenzmarker das Nourseothricin-Resistenzgen (Nat^R). Bei einer Selektion mit Hygromycin und Nourseothricin konnten so Transformanten selektiert werden, die beide Resistenzen besaßen.

Die Überprüfung der erhaltenen Transformanten nach der Protoplastentransformation der Δ FgCPP1-1 Mutante fand wieder zunächst mittels PCR, mit FgCPP2 spezifischen Primern, statt. Es konnte eine Deletionsmutanten identifiziert werden (Abb. 43-B).

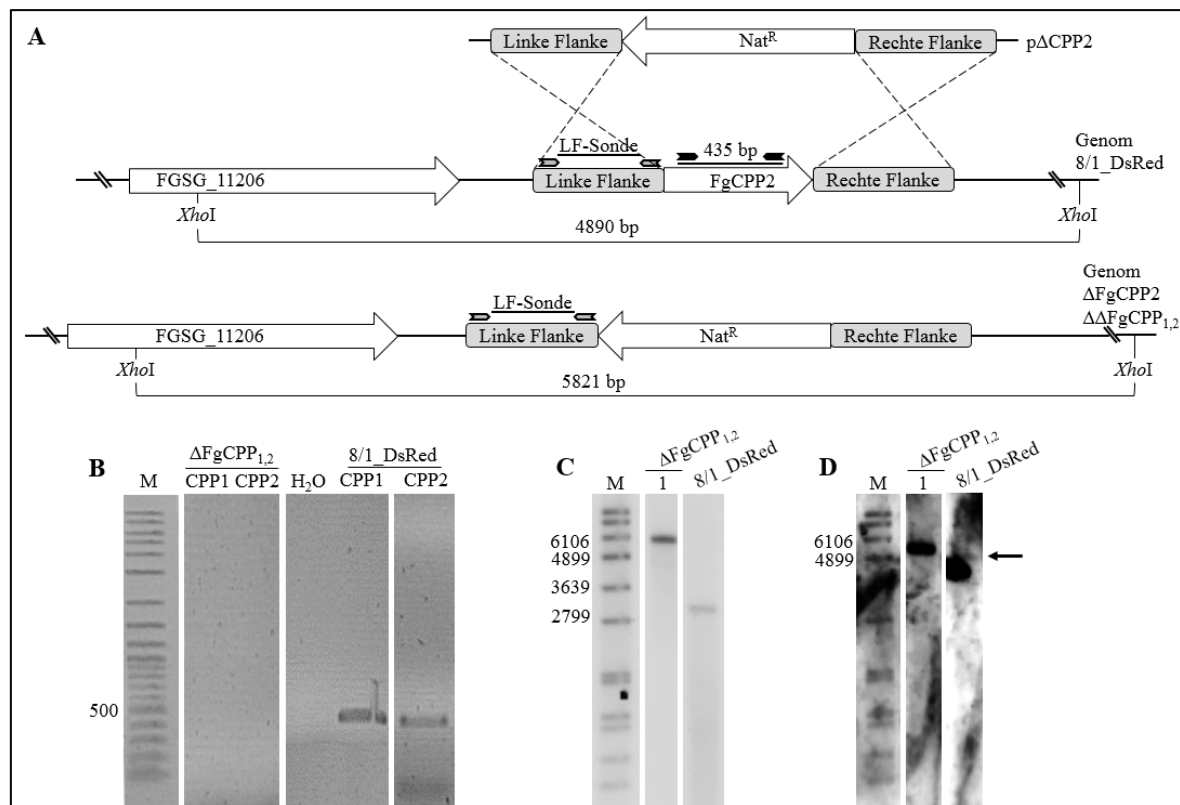


Abb. 43: Schematische Darstellung der Generierung von Deletionsmutanten des Gens FgCPP2 (FGSG_11205) in der Δ FgCPP1-1 Mutante mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen doppelten Deletion. **A** Schematische Darstellung der homologen Rekombination im Genlokus von FgCPP2 (FGSG_11205). Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte in den Vektor pRS426 (Christianson et al., 1992) mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Es erfolgte eine homologe Integration des Deletionskonstruktes in das Genom der Δ FgCPP1-1. Die Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat^R) diente zur Selektion der Transformanten. **B** PCR-Nachweis der homologen Rekombination des Deletionskonstruktes in den nativen Lokus in erhaltenen Transformanten. Dazu wurden die Primer AG7_Int_FgSP2_fw und AG8_Int_FgSP2_rev (siehe A: schwarze Pfeilspitzen, Primersequenzen in 2.1.3, Tab. 2; CPP2 in B) generiert. Die Abwesenheit des PCR-Fragmentes in der Δ FgCPP_{1,2} Mutante ($\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2}: 0 bp, 8/1_DsRed: 435 bp) beweisen die Integration des Deletionskonstruktes in den nativen Genlokus. CPP1 steht für das Primerpaar zur Amplifizierung des Gens FgCPP1 (FGSG_10212); s. Abb. 42) **C** Southern Blot Analyse von Transformanten, die in der PCR eine Deletion des FgCPP2 Gens zeigten. Hierfür wurde die mit XhoI-restringierte genomische DNA von 8/1_DsRed und einer erhaltenen $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutante (1) mit einer Sonde für die linke Flanke (LF-Sonde, siehe Abb. 42-A) hybridisiert. In der $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutante 1 konnte eine Bande von 6098 bp detektiert werden. 8/1_DsRed weist ein Signal bei 3060 bp auf (schwarzer Pfeil). **D** Southern Blot Analyse der $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutante 1.

Hierfür wurde ebenfalls *XhoI*-restringierte genomische DNA dieser Mutante und von 8/1_DsRed mit einer Sonde für die linke Flanke des FgCPP2 Gens (LF-Sonde, siehe A) hybridisiert. In der $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutante 1 konnte eine Bande von 5821 bp detektiert werden. 8/1_DsRed weist ein Signal bei 4890 bp auf (schwarzer Pfeil deutet auf die Bande). Marker (M) B: Gene Ruler 1kb Plus (Thermo Scientific), Marker C: DNA Molecular Weight Marker VII, DIG labeled (Roche).

Die per PCR nachgewiesenen Deletionsmutante $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2}-1 wurde ebenfalls über eine Southern Blot Analyse überprüft. Hierfür wurden Sonden sowohl für die linke Flanke von FgCPP1 (Abb. 43-C), als auch von FgCPP2 (Abb. 43-D) verwendet. Für die Doppel-Mutante wurde sowohl das 6098 bp-große Fragment für eine FgCPP1 Deletion (Abb. 43-C), als auch das für eine FgCPP2 Deletion (5821 bp, Abb. 43-D) nachgewiesen. Der Referenzstamm 8/1_DsRed zeigte für FgCPP2 das 4890 bp Wildtyp-Fragment.

Die Deletion der Gene FgCPP1 und FgCPP2 konnte erfolgreich innerhalb einer Transformande nachgewiesen werden.

3.3.3 Δ FgCPP Mutanten bilden Wildtyp-ähnliche Infektionsstrukturen während der Infektion auf Weizenvorspelzen aus

Im vorherigen Kapitel konnten sowohl Einzel- als auch Doppeldeletionsmutanten der CPP Gene in *F. graminearum* nachgewiesen werden. Nun galt es herauszufinden, welche Rolle diese während der Infektion von Weizen einnehmen. Hier wurde zunächst die Etablierung der Infektionsstrukturen in der frühen Infektionsphase untersucht. Dazu wurden Weizenvorspelzen mit Konidien der Einzel- und Doppelmutanten und des Referenzstammes 8/1_DsRed inokuliert und nach 6 Tagen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Aufnahmen der Infektionsstrukturen sind in der Abbildung 44 dargestellt.

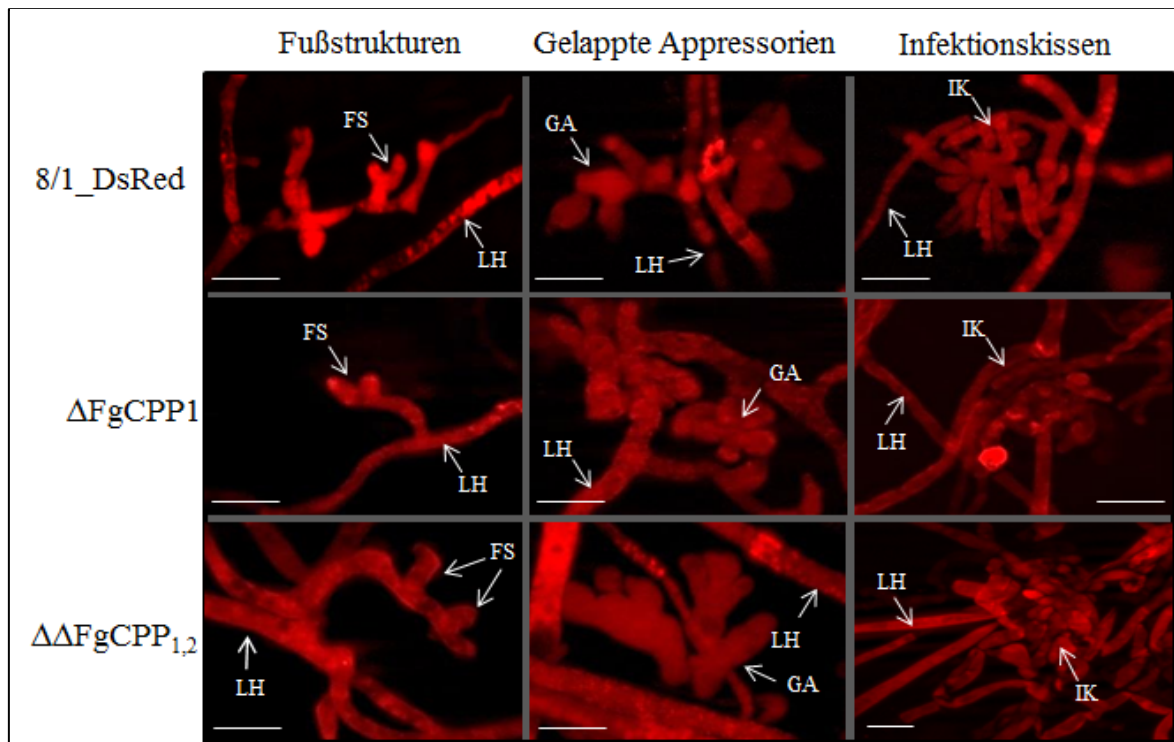


Abb. 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Infektionsstrukturen auf Weizenvorspelzen der $\Delta FgCPP1$ und $\Delta\Delta FgCPP_{1,2}$ Mutanten sowie des 8/1_DsRed Stammes, 6 dpi. Vorspelzen wurden aus Weizenblüten präpariert und mit 100 Konidien der $\Delta FgCPP1$ und $\Delta\Delta FgCPP_{1,2}$ Mutanten bzw. des 8/1_DsRed Stammes inokuliert. Die konstitutive Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRed ermöglichte die fluoreszenzmikroskopische Identifizierung von Infektionsstrukturen. Es wurden Maximumintensitätsprojektionen von Z-Stapel-Aufnahmen an einem „Axio Imager Z1“ Mikroskop (Zeiss, München, Deutschland) generiert. Längenmaß: 10 μm . FS = Fußstrukturen, LH = Laufhyphen, GA = Gelappte Appressorien, IK = Infektionskissen.

Beim Vergleich der Infektionsstrukturen in Abbildung 44 können keine Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Referenzstamm 8/1_DsRed beobachtet werden. Sowohl die einzelligen Fußstrukturen, als auch die gelappten Appressorien und die komplexen Infektionskissen können trotz der Deletion von FgCPP1 bzw. FgCPP1 und FgCPP2 ausgebildet werden. Diese CPPs scheinen demnach keinen Einfluss auf die Ausbildung von Infektionsstrukturen zu haben.

3.3.4 Die Deletion zweier Cerato-platanin Gene hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *F. graminearum*

Die CPPs FgCPP1 und FgCPP2 sind für die Ausbildung von Infektionsstrukturen nicht von Bedeutung. Ob sie dennoch wichtig für die Infektion von Weizen sind wurde in einem nächsten Schritt überprüft. Hierfür wurde das Schadbild von Weizenpflanzen nach 21 Tagen ausgewertet, die mit Konidien der Mutanten bzw. des 8/1_DsRed Stammes inokuliert wurden (Abb. 45).

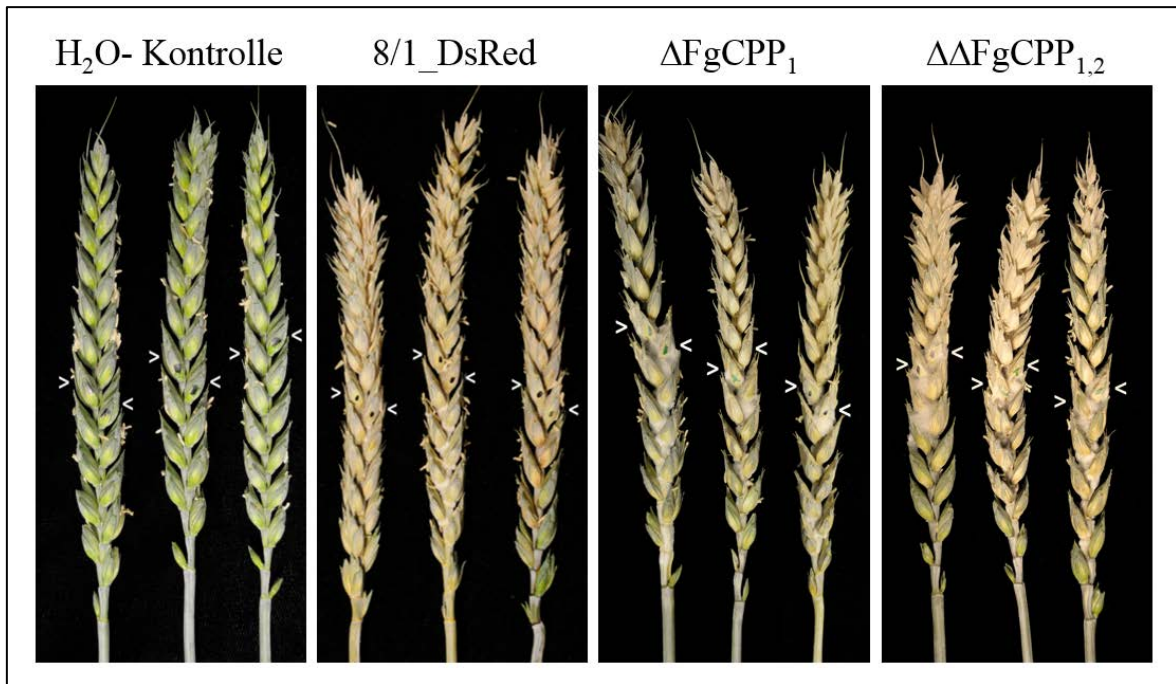


Abb. 45: Überprüfung der Pathogenität generierter Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutanten auf Weizen des Kultivars „Nandu“. Schadbilder von Weizenähren nach erfolgter Infektion mit Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutanten und dem 8/1_DsRed, 21 dpi. Weizenblüten wurden im Entwicklungsstand der Anthesis mit 200 Konidien des zu untersuchenden Stammes an zwei Blüten punktinokuliert (weiße Pfeilspitze). Der 8/1_DsRed diente als Positivkontrolle (vollständige Infektion der Weizenähre) und eine Inokulation mit sterilem Wasser als Negativkontrolle (FHB-Symptom freie Ähre). Nach 21 Tagen zeigten alle mit Konidien inokulierten Ähren die typischen Symptome der Ährenbleiche. Pro untersuchten Pilzstamm wurden 10 Ähren inokuliert.

Das typische Ausbleichen der Ähren konnte sowohl für den Referenzstamm, als auch für die Einzel- und Doppelmутanten beobachtet werden (Abb. 45). Die Weizenähren konnten kolonisiert werden. Neben der Ausbildung von Infektionsstrukturen scheinen FgCPP1 und FgCPP2 ebenfalls unwichtig für den Infektionsverlauf zu sein.

3.3.5 Die Deletion von FgCPP1 und FgCPP2 führt nicht zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem oder osmotischem Stress

Dass die CPPs FgCPP1 und FgCPP2 für die Ausbildung von Infektionsstrukturen erlässlich sind wurde bereits nachgewiesen. Auch die Infektion von Weizenpflanzen ist trotz der Deletion beider Gene nicht beeinträchtigt. In beiden Fällen konnte kein Unterschied zum Referenzstamm 8/1_DsRed beobachtet werden.

Die Mutanten wurden deshalb hingehend anderer Funktionen *in vitro* überprüft. Sie wurden sowohl oxidativem Stress durch die Zugabe von H₂O₂, als auch osmotischem Stress durch NaCl ausgesetzt. Die Abbildung 46 zeigt das Wachstum der FgCPP Einzel- und Doppelmутanten und des Referenzstammes unter diesen Stressbedingungen.

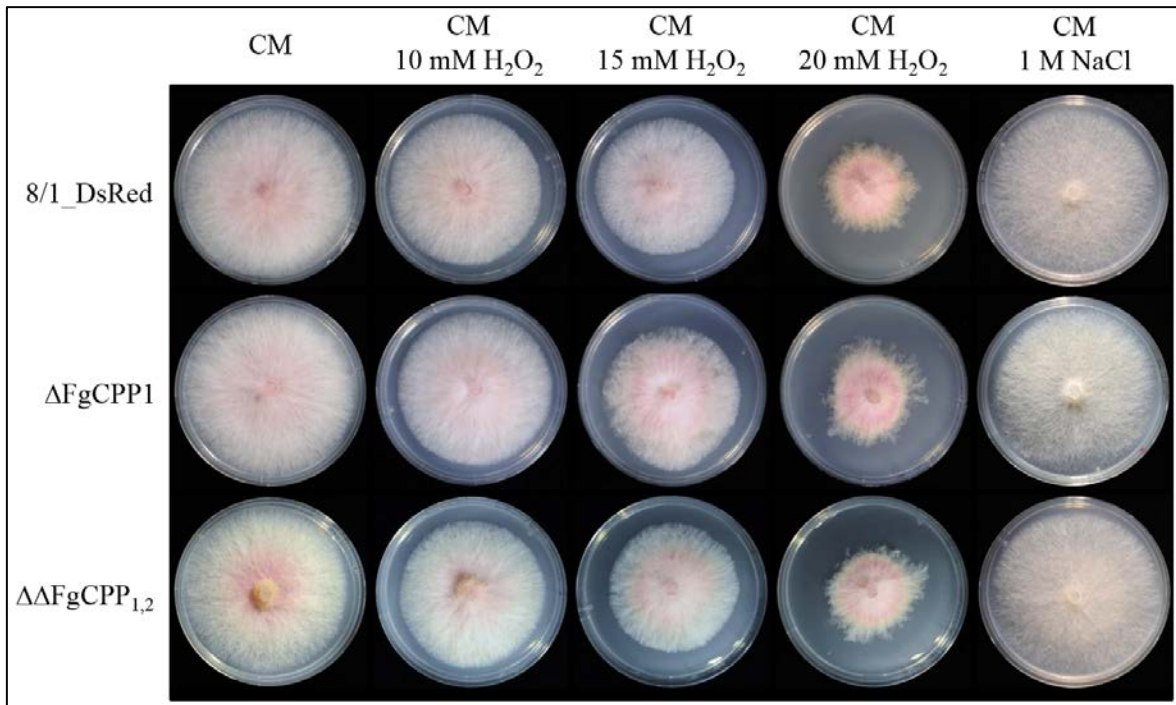


Abb. 46: Überprüfung der Sensitivität von Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutanten bzw. des 8/1_DsRed Stammes gegenüber oxidativem und osmotischem Stress. Die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress wurde auf CM-Festmedium durch die Zugabe von 10, 15 oder 20 mM H₂O₂, gegenüber osmotischem Stress mit 1 M NaCl getestet. Für die Beimpfung der Testplatten wurden Myzelblöcke einer CM-Starterplatte ausgestanzt. Es folgte die Inkubation der Platten für 3 Tage bei 28 °C. Es wurden pro Bedingung und Pilzstamm 3 technische Replikate angefertigt.

Wie sich anhand der Abbildung 46 erkennen lässt, verhalten sich die Δ FgCPP1 und $\Delta\Delta$ FgCPP_{1,2} Mutanten sowohl unter oxidativen, als auch unter osmotischen Stressbedingungen wie der 8/1_DsRed Stamm.

Somit kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die CPPs FgCPP1 und FgCPP2 für den Erhalt der ROS-Homöostase, bzw. für das Wachstum unter osmotischen Stressbedingungen, zuständig sind.

3.3.6 Fazit: Die Cerato-platanin Proteine FgCPP1 und FgCPP2 haben keinen Einfluss auf die Weizenblüteninfektion von *F. graminearum*

F. graminearum besitzt fünf Gene mit putativer Cerato-platanin Domäne. Die Cerato-platanin Proteine FgCPP1 und FgCPP2 zeigten nach bioinformatischer Analysen die größte Homologie zu bereits charakterisierten CPPs anderer Ascomyceten. Den CPPs BcSp11 aus *B. cinerea* bzw. MSP1 aus *M. oryzae* konnte eine Funktion während der Infektion der Wirtspflanze nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Homologie wurden FgCPP1 einzeln, und FgCPP2 in einer Δ FgCPP1 Mutante, deletiert und charakterisiert. Sowohl Einzel- als auch Doppelmутanten konnten sowohl Infektionsstrukturen ausbilden, als auch die typischen Symptome der Ährenbleiche auf Weizen hervorrufen. Eine Funktion in der Bewältigung von oxidativem oder osmotischem Stress konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Mutanten waren ebenso sensitiv gegenüber H₂O₂ und NaCl wie der dazugehörige Referenzstamm 8/1_DsRed.

4. Diskussion

4.1 Expressionsprofile differentieller Transkriptome können mittels qRT-PCR validiert werden

F. graminearum bildet im Zuge der Infektion von Weizen Laufhyphen aus die es ihm ermöglichen, sich zunächst auf der pflanzlichen Oberfläche epiphytisch auszubreiten ehe er sich durch die Ausbildung komplexer Infektionskissen in die Lage versetzt, die Oberfläche zu durchdringen und sich im Inneren des Pflanzengewebes auszubreiten (Boenisch & Schäfer, 2011). Doch worin unterscheiden sich diese beiden Strukturen, Laufhyphen und Infektionskissen, abgesehen von ihrer Morphologie? In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wilhelm Schäfer (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) wurde über die Illumina-Sequenzierung von cDNA Banken ein differentielles Transkriptom erstellt, welches die Genexpressionen in Laufhyphen (LH) mit denen in Infektionskissen (IK) vergleicht. Um außerdem zu entschlüsseln, welche Unterschiede es zwischen Infektionsstrukturen und einer *in vitro* Kultur gibt (MY), wurde hiervon ebenfalls das Transkriptom analysiert und für den Vergleich herangezogen.

Die differentiellen Expressionen, die hieraus resultierten, mussten unter der Verwendung einer zweiten Methode neben der Sequenzierung, wie der qRT-PCR, validiert werden. Dies wurde bereits für andere Sequenzierungsdaten durchgeführt (Foroud et al., 2012; Bai et al., 2013; Sharma et al. 2016). Bei den analysierten Genen handelte es sich um FgTRI5, eine Trichodien-Synthase und das erste Gen der DON-Biosynthese, FgPKS12, die Polyketidsynthase 12 aus dem Synthesecuster des Polyketids Aurofusarin, FgEF1, ein *Fusarium* spezifischer Effektor und zwei GABA-Transaminasen, FgGTA1 und FgGTA2. Als Haushaltsgene standen drei zur Wahl: β -Tubulin, Ubiquitin und Cofilin. Da sich sowohl LH, als auch IK und MY morphologisch voneinander unterschieden wurde überprüft, welche Haushaltsgene unter allen drei Bedingungen am stabilsten waren. Die Analyse mit „RefFinder“ hat hierbei ergeben, dass Ubiquitin und Cofilin die geeignetsten Gene für die Normalisierung waren (Tab. 9).

Die Ergebnisse der qRT-PCR spiegeln die der Transkriptom-Sequenzierung wieder. FgTRI5 und FgGTA2 zeigen den höchsten FPKM in IK an, gefolgt von LH und den niedrigsten Wert für MY. Die Validierung hat eine signifikante Hochregulierung dieser Gene in IK und LH im Vergleich zu MY ergeben. Für FgGTA1 wurde das meiste Transkript in LH detektiert, am wenigsten in MY. Auch diese Tendenz konnte durch die qRT-PCR reproduziert werden, da FgGTA1 eine verringerte Expression in IK im Vergleich zu LH aufzeigt, der Vergleich IK bzw. LH zu MY jedoch zu einer eindeutigen Hochregulierung führt. FgPKS12 wurde ebenfalls nachweislich am stärksten in LH, FgEF1 in MY, exprimiert.

Es kann abschließend festgehalten werden, dass Expressionsprofile aus Sequenzierungen durch die Verwendung der qRT-PCR Methode reproduziert werden können.

4.2 Das Mykotoxin DON ist ein wichtiger Virulenzfaktor für die initiale Infektionsphase von Weizen

Das von *F. graminearum* produzierte Sesquiterpen Deoxynivalenol (DON) ist ein wichtiger Virulenzfaktor für die erfolgreiche Infektion von Weizen. Wird die DON Synthese unterbunden, kann der Pilz nur noch die inokulierte Blüte infizieren und nicht über den Rachisknoten dieser Blüte hinauswachsen (Proctor et al. 1995, Maier et al. 2006). Des Weiteren kann die Barrierebildung, durch die Verdickung der pflanzlichen Zellwand, nach der Penetration nicht unterbunden werden (Jansen et al., 2005, Bai et al., 2002, Maier et al., 2006). Dies verdeutlicht, dass DON eine wichtige Rolle in der frühen Infektionsphase von Weizen spielt. Doch inwieweit die Infektion vor der Überwindung des Rachisknotens beeinflusst wird, ist bisher nicht bekannt und wurde aus diesem Grund näher untersucht.

Hierfür wurden mit dem 8/1_GFP, bzw. mit dem 8/1DsRed Stamm, und einer Δ Tri5_GFP Mutante inokulierte Weizenblüten nach 3 bzw. nach 5 Tagen geerntet und sowohl histologisch untersucht als auch die Konzentration an Pilz-gDNA molekular quantifiziert.

Die Visualisierung des Pilzwachstums innerhalb der Pflanze nach 5 Tagen zeigte eine deutliche Reduktion der sichtbaren Fluoreszenz für die Δ Tri5_GFP Mutante im Vergleich zur Referenz. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass sich die DON-Defizienz auf die frühe Infektionsphase auswirken könnte. Das Ergebnis der Quantifizierung bestärkte diese Vermutung. Hier konnte bereits zum Zeitpunkt 3 dpi eine Reduktion des Wachstums für die Mutante beobachtet werden, welcher nach 5 dpi noch deutlicher wurde. Zu dem späteren Zeitpunkt konnte im Vergleich zur Mutante fast die 3-fache Pilzmenge für den 8/1_DsRed Stamm bestimmt werden. DON ist demnach nicht nur für die Überwindung des Rachisknotens und der damit einhergehenden Kolonisierung der Weizenähre entscheidend sondern schon bei der initialen Infektion.

Doch welche Funktion könnte DON in dieser Phase haben? Versuche mit synthetischem DON haben gezeigt, dass Konzentrationen zwischen 100 und 200 mg/L die ROS Produktion in infiltriertem Weizengewebe induziert. Des Weiteren führte diese Behandlung zu einer erhöhten Rate an abgestorbenen Weizenzellen (Desmond et al., 2008). Ob DON den programmierten Zelltod, direkt oder indirekt durch die Induktion der ROS Produktion, einleitet blieb ungeklärt. Gleiches konnten Diamond et al. (2013) mit 120 ppm (mg/l) DON erreichen. Der programmierte Zelltod wurde induziert. Die Autoren überprüften außerdem die Wirkung von geringen DON-Konzentrationen. Hier zeigte sich ein anderes Ergebnis: Während die sehr hohen Konzentrationen zu einer Induktion des programmierten Zelltods führten, konnte eine Konzentration von 10 ppm DON diesen inhibieren (Diamond et al., 2013). Die Behandlung von Blüten des Modelorganismus *Brachypodium distachyon* mit 1 ppm DON vor der Inokulation mit *F. graminearum* führte ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch hier konnte gezeigt werden, dass höhere Konzentrationen an DON (50- 500 ppm) Nekrosen hervorrufen (Blümke et al., 2014).

Um zu überprüfen, ob ähnliches auch während einer Infektion mit *F. graminearum* zu beobachten ist, wurden Zellkulturen von *Arabidopsis* entweder mit Konidien eines Wildtyps oder einer Δ Tri5 Mutante versetzt. Nach 24 Stunden konnte für beide Stämme ähnliche Infektionsraten der Zellkulturen beobachtet werden. Diese wurden einer Wärmebehandlung unterzogen um den programmierten Zelltod zu induzieren. Interessanterweise konnte nur für 8,2% der Zellen der programmierte Zelltod nach einer Wildtyp-Infektion nachgewiesen

werden. Hingegen waren 68% der Δ Tri5 infizierten Zellen abgestorben. So konnte sowohl mit synthetischem DON, als auch mit einer Pilzinfektion der programmierte Zelltod inhibiert werden (Diamond et al., 2013).

Über den Lebensstil von *F. graminearum* sind sich die Phytopathologen uneinig. Brown et al. (2010) z.B. ordnen dieses Pathogen zu den hemibiotrophen Pilzen. Dabei konnten bereits Nekrosen in der frühen Infektionsphase von Weizenblütenblättern beobachtet werden (Boenisch & Schäfer, 2011). Dies bekräftigt das Fehlen einer biotrophen Phase. Allerdings wird auch diskutiert, ob die Entstehung dieser Nekrosen auf die vielen Penetrationssporen zurückgeführt werden können, die durch die gebildeten Infektionskissen entstehen.

Die Induktion der DON Synthese findet schon sehr früh in den Infektionsstrukturen, auch in den weniger komplexen, gelappten Appressorien, statt (Boenisch & Schäfer, 2011). Der programmierte Zelltod wird von Pflanzen induziert, um angreifende Pathogene einzudämmen. Besäße *F. graminearum* eine kurze, biotrophe Phase, würde DON in geringen Konzentrationen sekretiert und so den Zelltod zunächst inhibieren, wodurch der Pilz in der Lage wäre, sich ungehindert in den ersten Pflanzenzellen auszubreiten. Dieses Infektionsverhalten ist charakteristisch für hemibiotrophe Pilze, wie am Beispiel von *M. grisea* gezeigt werden konnte (Talbot, 2003; Koga et al., 2004). Das Fehlen von DON in der Δ Tri5_GFP Mutante führt hingegen zur Initiierung des Zelltods, die erste, initiale Ausbreitung im intakten Pflanzengewebe würde unterbunden werden. Es kommt zu einer Verringerung der Virulenz und einer Induktion von Abwehrmaßnahmen, wie die Verdickung der Zellwand durch die Einlagerung von z.B. Callose (Blümke et al., 2014).

Besäße *F. graminearum* keine biotrophe Phase, wären hohe DON-Konzentrationen erforderlich um den programmierten Zelltod wie bei Desmond et al. (2008) zu induzieren. Als nekrotropher Pilz benötigt dieser abgestorbenes Pflanzengewebe für die Nährstoffaufnahme. Dass *F. graminearum* hohe Konzentrationen an DON (100 bis 200 mg/kg) *in planta* zu frühen Zeitpunkten sekretiert, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Im Zuge einer Zeitreihe zur Bestimmung von Butenolid in infiziertem Pflanzenmaterial wurde ebenfalls die Konzentrationen an DON bestimmt (s. Anhang 8.3, Tab. 21). Nach 48 Stunden konnten bereits Konzentrationen zwischen 105 und 259 ppm DON gemessen werden. So wäre folgendes Szenario denkbar: Die hohe DON Konzentration, die in das Pflanzengewebe sekretiert wird, induziert direkt, oder indirekt durch die Induktion der ROS-Produktion, den Zelltod der Pflanzenzellen, wodurch es dem Pilz erleichtert wird an Nährstoffe zu gelangen die für die initiale Ausbreitung und das Wachstum notwendig sind. Das Fehlen von DON in der Δ Tri5_GFP Mutante hingegen führt dazu, dass die initiale Nährstoffaufnahme gestört ist. Das Wachstum innerhalb der Pflanze ist deshalb ebenfalls gestört, bzw. verringert.

Ein weiterer Aspekt, der diese Theorie bekräftigt, ist ein metabolisches Profil infizierter Rachisknoten von Weizenblüten, welches von Dr. Jakob Bönnighausen im Rahmen seiner Dissertation angefertigt wurde. Hier wurden Veränderungen des Metaboloms nach einer Wildtyp bzw. einer Δ Tri5 Infektion untersucht. Es zeigte sich, dass die Infektion des Wildtyps zu einer erhöhten Bildung von oxidiertem Glutathion im Vergleich zur Δ Tri5 Infektion führt. Zusammen mit Ascorbat sind diese beiden Metabolite an der ROS-Detoxifizierung innerhalb des Glutathion-Ascorbat-Zyklus beteiligt. Gleichzeitig kommt es zur Akkumulation von z.B. Peroxylipiden und oxidierten Nukleinsäuren in Wildtyp-infiziertem Gewebe, was auf eine ROS-Schädigung zurückgeführt werden kann. Ilgen et al.

(2009) haben gezeigt, dass der Rachisknoten zu einer starken Induktion der DON-Synthese führt. Dieser Umstand legt die Theorie nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen der DON-Synthese und dem Auftreten von ROS gibt. Wie zuvor erwähnt, konnten Desmond et al. (2008) ebenfalls durch die Infiltration von DON in Pflanzengewebe die Produktion von ROS induzieren. Die verstärkte Detektion ROS-geschädigter Metabolite könnte daher auf die Sekretion von DON zurückgeführt werden.

Die Metabolom-Analysen haben ebenfalls ergeben, dass es nur bei der Wildtyp-Infektion zu einem Anstieg von Dihydroceramid im Rachisknoten kommt. Liang et al. (2003) haben gezeigt, dass Ceramid C2 und Dihydroceramid C2 die Apoptose in *Arabidopsis thaliana* auslösen können. Die erhöhte Konzentration an Dihydroceramid nach der Wildtyp-Infektion könnte ein Hinweis auf die apoptotische Wirkung von DON *in planta* sein, wie es auch von Desmond et al. (2008) und Diamond et al. (2013) gezeigt wurde.

Aus Sequenzierungsdaten eines Transkriptoms von *F. graminearum* geht hervor, dass, neben DON, das Synthesecuster des Sekundärmetabolits Butenolid während der Kolonisierung des Pflanzengewebes stark exprimiert wird (unveröffentlichte Daten, Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

Ob die Butenolid-Synthese in der Δ Tri5_GFP Mutante verändert ist, ist nicht bekannt und wurde aus diesem Grund untersucht. Hierfür wurde infiziertes Pflanzenmaterial mittels LC-MS/MS analysiert. Die normalisierten Butenolid-Konzentrationen zeigten, dass für die Δ Tri5_GFP Mutante eindeutig weniger Butenolid nachgewiesen wurde als für den 8/1_DsRed Stamm. Betrachtete man sich jedoch die ermittelte DNA-Konzentration, so erreichte die Mutante nicht einmal nach fünf Tagen das Niveau des Referenzstammes nach drei Tagen. Im nachfolgenden Kapitel wird entschlüsselt, zu welchem Zeitpunkt die Synthese von Butenolid im 8/1_DsRed Stamm induziert und ab wann dieses Metabolit nachgewiesen werden kann. Möglicherweise befindet sich die Δ Tri5_GFP Mutante nach fünf Tagen, aufgrund des reduzierten Wachstums, erst in dem Stadium, in dem die Butenolid-Synthese eingeleitet wird. Da die Synthese erst beginnt, könnte nur eine geringe Konzentration nachgewiesen worden sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass DON, neben der Kolonisierung des Rachisknotens, ebenfalls in der initialen Infektionsphase von Bedeutung ist, da eine DON-defiziente Mutante bereits zum Zeitpunkt 3 dpi eine deutliche Verringerung der Virulenz aufzeigt. Diese Reduktion könnte auf die fehlende Induktion des programmierten Zelltods im inokulierten Ährchen zurückzuführen sein. Die Initiierung des programmierten Zelltods würde es dem Pilz ermöglichen, schon frühzeitig Nährstoffe aus dem abgestorbenen Pflanzengewebe aufzunehmen um diese für die weitere Ausbreitung zu nutzen.

4.3 Das Sekundärmetabolit Butenolid wird in der frühen Phase der Infektion von Weizen gebildet

Die Gene, die für die Synthese des Butenolids von *F. graminearum* benötigt werden, liegen in einem Cluster vor. Dieses wurde 2006 von Harris et al. durch den Vergleich mehrerer *F. graminearum* cDNA Datenbanken identifiziert. Es zeigte sich, dass die acht identifizierten Clustergene sowohl unter Deoxynivalenol (DON)-induzierenden Bedingungen, als auch in infiziertem Pflanzengewebe ko-exprimiert wurden. An das Cluster angrenzende Gene wurden nicht induziert.

Die *in silico* Analyse der Proteinsequenzen dieser acht Clustergene ergab, dass es sich hierbei um Proteine mit unterschiedlichen Funktionalitäten handelt. Das Cluster beinhaltet sowohl modifizierende Enzyme, als auch einen Zn(II)₂Cys₆ Transkriptionsfaktor. Dieser ähnelt dem Protein GAL4, einem pilz-spezifischen Regulator aus *S. cerevisiae* (Johnston 1987; Johnston & Carlson 1992). Ein MFS-Transporter innerhalb des Clusters deutet auf die mögliche Sekretion des Butenolids hin und wurde durch jene *in vitro* Versuche bestätigt, bei denen Butenolid im Medium nachgewiesen werden konnte (Harris et al., 2006). Diese Zusammenstellung entspricht der Beschreibung eines Clusters von Keller und Hohn (1997). Über die Regulation des Butenolid-Clusters in diversen *F. graminearum* Stämmen während der Infektion ist ebenfalls schon einiges bekannt. Expressionsanalysen mit der Affymetrix Gen-Chip Methode haben gezeigt, dass 24 Stunden nach der Inokulation von Gerste mit *F. graminearum* vier der acht Gene des vermuteten Butenolid-Clusters detektierbar waren. Nach 48 Stunden konnte die Expression aller acht Gene nachgewiesen werden (Güldener et al., 2006). 2014 haben Sieber et al. durch die Verwendung unterschiedlicher *in silico* Methoden 67 mögliche Gencluster identifiziert, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten zuständig sein könnten. Hierfür wurden ebenfalls diverse cDNA Datenbanken von der „PlexDB“ Datenbank verwendet. Es zeigte sich, dass auch hier sowohl in der frühen Infektionsphase von Gerste, als auch in der von Weizen alle Clustergene nachgewiesen werden konnten. Zu welchem Zeitpunkt Butenolid jedoch tatsächlich synthetisiert und nachgewiesen werden kann ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Der in dieser Arbeit verwendete *F. graminearum* Stamm war der 8/1_DsRed. Dieser Stamm besaß den genetischen Hintergrund des 8/1-Isolates (Miedaner et al., 2000). Für die bessere Visualisierung des Pilzes innerhalb der Pflanze wurde die Gensequenz für das rot fluoreszierende Protein DsRed in das Genom ektopisch integriert. Über dieses Isolat gibt es bislang weder Informationen über die Regulation, noch über den Zeitpunkt der Butenolidsynthese. Es wurde deshalb überprüft, zu welchem Zeitpunkt während der frühen Infektionsphase die Clustergene exprimiert werden und, ab wann Butenolid nachgewiesen werden kann.

Die LC-MS/MS Analyse hat ergeben, dass bereits nach 48 Stunden Butenolid synthetisiert wurde, wohingegen nach 24 Stunden noch kein Butenolid nachweisbar war. Die Induktion der Butenolid-Synthese scheint demnach zwischen 24 und 48 Stunden zu beginnen (s. Tab. 10). Betrachtet man sich die Ergebnisse der PCR (s. Abb. 11), so kann von den Clustergenen nur das Gen FGSG_08080 nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um den Zn(II)₂Cys₆ Transkriptionsfaktor. Transkriptionsfaktoren binden an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb der Promotorregionen und können somit die Transkription induzieren oder reprimieren. Gencluster, die für die Synthese von Sekundärmetaboliten zuständig sind, enthalten oft einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription anderer

Clustergene reguliert. $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ Transkriptionsfaktoren sind typische, an der Sekundärmetabolit-Synthese beteiligte Transkriptionsfaktoren. Sie können sowohl Metabolit-spezifisch sein (Woloshuk et al., 1994; Fernandes et al., 1998; Chang et al. 1999) als auch als globale Regulatoren fungieren (Marzluf, 1997; Tilburn et al., 1995; Dowzer & Kelly, 1991). Der Nachweis des $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ Transkriptionsfaktors 24 Stunden nach der Inokulation als einziges Transkript könnte darauf hindeuten, dass dieser für die Initiierung der Butenolid-Synthese zuständig ist. Die Berechnung der Bandenintensität im Vergleich zu β -Tubulin zeigt sogar eine deutlich erhöhte Expression (3,604, vgl. Tab. 12). Zu späteren Zeitpunkten ist die Expressionstärke von FGSG_08080 mit der des Haushaltsgens vergleichbar.

Nach 48 Stunden zeigen sieben der acht Gene eine Bande. Dieses Expressionsprofil des Clusters unterscheidet sich von den bisher bekannten. Durch die Erstellung von cDNA Datenbanken konnten Güldener et al. (2006) vier der acht Gene bereits 24 Stunden nach der Inokulation von Gerste detektieren, alle acht hingegen nach 48 Stunden. Bei dem dort verwendeten *F. graminearum* Isolat handelte es sich um NRRL38661. Auch Sieber et al. (2014) zeigten, dass in der frühen Weizeninfektion alle Butenolid-Clustergene zu einem Zeitpunkt gleichzeitig nachweisbar waren. Hier wurde der Wildtypstamm PH-1 für die Infektion verwendet. Der in dieser Arbeit verwendete 8/1_DsRed Stamm, der den 8/1-Wildtyp Hintergrund hat, scheint demnach eine andere Regulation des Butenolid-Clusters aufzuweisen, da sowohl nach 24 und 48 Stunden, als auch zu späteren Zeitpunkten nie alle Gene nachweisbar waren.

Das Transkript für FGSG_08083 konnte zu keinem Zeitpunkt, FGSG_08082 zumindest nach 2 und 4 dpi nachgewiesen werden. Der Unterschied in der Regulation der untersuchten Isolate könnten auf genomische Unterschiede zurückzuführen sein. Walker et al. (2001) haben genomische Profile von 24 kanadischen *F. graminearum* Isolaten mittels RAPD (engl. Random Amplified Polymorphic DNA) erstellt. Schon auf genomischer Ebene unterschieden sich diese Isolate teilweise beträchtlich voneinander. Diese genomischen Unterschiede könnten auf Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) zurückzuführen sein. Bei SNPs handelt es sich um Variationen einzelner Basenpaare innerhalb einer Gensequenz, die im gesamten Genom vorkommen können. Beim Vergleich mehrerer Isolate könnte eine solche Variation innerhalb eines Bindemotives für einen Transkriptionsfaktor dazu führen, dass die Initiierung der Genexpression verändert ist. Im Zuge einer Genom-Sequenzierung des 8/1 Wildtypstammes von *F. graminearum* konnten bereits deutliche Unterschiede zum Stamm PH-1 identifiziert werden (unveröffentlichte Daten, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg).

Innerhalb der Bestimmung des Verhältnisses von Pixelintensitäten der Banden im PCR-Gel konnten neben der abnehmenden Expression des Transkriptionsfaktors Expressionsveränderungen der anderen Clustergene beobachtet werden. Die Expression der Gene FGSG_08077 und FGSG_08079 ist während des Zeitraumes 2 bis 5 dpi stabil. Interessanterweise nimmt die Expression des Transporters (FGSG_08084) im Verlauf der Zeit ab. Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass die Sekretion von Butenolid vermindert oder eingestellt wird, was im Umkehrschluss bedeuten könnte, dass die Synthese ebenfalls zum Erliegen kommen könnte. Tatsächlich nahm die gemessene Butenolid-Konzentration im Laufe der Zeit ab. Die höchste Konzentration konnte nach 2 dpi, die niedrigste nach 5 dpi gemessen werden. Die Gene FGSG_08078 (Amidase) und

FGSG_08081 (2-Oxoglutarat-Fe(II) Oxygenase) weisen innerhalb des Zeitraumes 2 bis 5 dpi eine Expressionserhöhung auf. Amidasen katalysieren die Spaltung von Amidbindungen. FGSG_08078 könnte somit an der Bildung der Amidgruppe des Butenolids beteiligt sein. Da die Konzentration an Butenolid im Verlauf der Zeit sinkt, die Expression von FGSG_08078 jedoch ansteigt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Amidase-Aktivität von FGSG_08078 ebenfalls für andere Prozesse benötigt wird. Für diese Annahme spricht die Analyse des Transkriptoms einer axenischen Kultur von *F. graminearum*. Hier konnten Transkripte der Gene FGSG_08077 und FGSG_08078 nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten, Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg). Dass FGSG_08081 als 2-Oxoglutarat-Fe(II) Oxygenase ebenfalls eine zusätzliche Funktion während der Infektion einnimmt ist ebenfalls denkbar, da diese Enzymklasse diverse Reaktionen katalysiert, die typischerweise zur Oxidation organischer Substrate unter Verwendung von O₂ führt (Prescott, 1993; Hegg & Que, 1997).

Die Expressionsänderungen der Clustergene im Zeitverlauf sollte jedoch mit der sensitiveren qRT-PCR Nachweismethode überprüft werden.

Die Induktion der Butenolidsynthese konnte zwischen 24 und 48 Stunden nach der Inokulation, das Metabolit selbst nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Die Butenolidsynthese kann somit der frühen Infektionsphase zugeordnet werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der clustereigene Transkriptionsfaktor, FGSG_08080, bereits nach 24 Stunden auf Transkriptebene nachweisbar ist, somit als Regulator für die anderen Gene agieren und deren Expression initiieren könnte. Diese Regulation des Butenolid-Clusters unterscheidet sich jedoch von denen anderer *F. graminearum* Wildtypen und könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass es neben genomischen Unterschieden ebenfalls Unterschiede in der transkriptionellen Regulation geben könnte

4.4 Butenolid defiziente Mutanten weisen in der frühen Infektionsphase von Weizen eine erhöhte Virulenz auf

Die Funktion von Butenolid in der frühen Infektionsphase ist bisher noch nicht bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass Butenolid-defiziente Mutanten in der Lage sind, Weizenähren in einem Langzeitversuch zu infizieren und zu kolonisieren. Sie unterscheiden sich in ihrer Infektion nicht vom eingesetzten Wildtyp (Harris et al., 2006). Die Auswertung von Transkriptomdaten ergab, dass das Butenolid-Synthesecoluster während der initialen Ausbreitung im pflanzlichen Gewebe stark exprimiert wird. Da Butenolid bereits zwischen 24 und 48 Stunden nach der Inokulation synthetisiert wird ist es durchaus vorstellbar, dass es eine bestimmte Funktion während der frühen Infektion einnimmt.

Für die drei unabhängigen Deletionsmutanten zeigte die histologische Untersuchung der frühen Infektionsphase und die Quantifizierung der Pilz gDNA eine erhöhte Virulenz gegenüber dem Referenzstamm. Die histologische Untersuchung der Ährcheninfektion zeigte, dass der 8/1_DsRed Referenzstamm die Weizenblüte nach 5 Tagen bis zum Rachisknoten befallen hatte, während die ΔBut Mutanten bereits im darüber- und darunterliegenden Bereich der Ähre zu detektieren waren (s. Abb. 17). Die Quantifizierung ergab eine 1,7 bis 2,6-fache Konzentration an nachgewiesener Pilz gDNA im Vergleich zur

Referenz. Die Reintegration der FGSG_08079 Sequenz (KΔBut Mutanten) konnte den Wildtyp-Phänotyp herstellen. KΔBut Mutanten infizierten nach fünf Tagen wieder bis zum Rachisknoten und auch die Konzentration an gDNA war im Vergleich zu den ΔBut-Mutanten reduziert. Allerdings wiesen die Komplementationsmutanten ebenfalls eine deutliche Verringerung in der Virulenz im Vergleich zum Referenzstamm auf.

Die Deletion zweier negativer Regulatoren der DON-Synthese führte sowohl zu einer erhöhten Virulenz, als auch zu einer verstärkten DON Synthese dieser Mutanten im Vergleich zum dazugehörigen Wildtyp. Es wurde deshalb überprüft, in welchem Maße die ΔBut-3 Mutante DON während der Infektion sekretierte. Die detektierten DON Konzentrationen waren nicht wesentlich im Vergleich zum 8/1_DsRed verändert. Dass die erhöhte Virulenz dieser Mutanten auf eine erhöhte DON-Produktion zurückzuführen ist kann somit ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass das Fehlen von Butenolid zur gesteigerten Virulenz in der frühen Infektionsphase führt ist, dass der Pilz nicht sofort von der Pflanze erkannt wird und aus diesem Grund Verteidigungsmaßnahmen von Seiten der Pflanze später einsetzen. Dies würde bedeuten, dass das Sekundärmetabolit Butenolid als Effektor fungiert. Nach Kamoun (2009) sind Effektoren vom Pathogen synthetisierte Substanzen, die entweder „die Strukturen und Funktionen von Wirtszellen verändern (Virulenzfaktoren oder Toxine) und/oder Verteidigungsmaßnahmen einleiten (Avirulenzfaktoren oder Elicitoren)“. Beispiele für Sekundärmetabolite, die als Virulenzfaktor fungieren, sind das von *Cochliobolus heterostrophus* synthetisierte T-Toxin (Walton, 1996) oder Cercosporin aus *Cercospora nicotianae* (Choquer et al., 2005). Ohne diese Toxine wären die Phytopathogene nicht in der Lage, ihren suszeptiblen Wirt erfolgreich zu infizieren. Avirulenzfaktoren werden von Pflanzen nur dann erkannt, wenn sie das dazugehörige Resistenzgen tragen (Flor, 1942, Stergiopoulos & de Wit, 2009). Beispiele für Avirulenzfaktoren gibt es auf Seiten der Sekundärmetabolite bisher nur ein bekanntes: Ein vom Gen ACE1 synthetisiertes Polyketid aus *Magnaporthe grisea*.

Bei ACE1 handelt es sich um ein Hybridprotein aus einer Polyketidsynthase und einem Nicht-ribosomalen Protein. Dem Wildtypstamm „Guy11“ von *M. grisea* ist es nicht möglich, resistente Reiskultivare zu infizieren (Dioh et al., 2000). 2003 haben Berruyer et al. herausgefunden, dass das Reisgen *Pi33* für die Erkennung von ACE1 und der damit einhergehenden Resistenz zuständig ist. Eine eingehende Charakterisierung des ACE1 Proteins wurde dann von Böhnert et al. (2004) durchgeführt. Es besitzt alle nötigen Sequenzmotive für eine enzymatische Aktivität. Lokalisationsstudien mit GFP während der Infektion haben gezeigt, dass das ACE1-Protein nicht sekretiert wird, sondern im Appressorium verbleibt. Außerdem führt die Deletion von ACE1 zu einer erfolgreichen Infektion ursprünglich resistenter Reiskultivare. Es wurde ebenfalls überprüft, ob das Protein per se, selbst ohne enzymatische Aktivität, für das Auslösen der Resistenz ausreicht. Durch die Veränderung einer Aminosäure wurde dies bewerkstelligt. Doch auch in diesem Fall war es *M. grisea* möglich resistente Pflanzen erfolgreich zu infizieren. Die enzymatische Aktivität, und nicht das Protein als solches, ist also notwendig, um die Resistenzantwort der Pflanze auszulösen. Sowohl die Deletion von ACE1, als auch das Fehlen einer enzymatischen Aktivität führt zur erfolgreichen Infektion zuvor resistenter Reissorten. Diese Ergebnisse zusammengefasst lassen den Schluss zu, dass ACE1 in die Synthese eines Metabolits involviert ist, das durch das Resistenzgen *Pi33* erkannt wird und dadurch zur

Avirulenz, bzw. Resistenz der Pflanze, führt. Welches Cluster für die Synthese zuständig ist und, um was für ein Metabolit es sich handelt ist bis jetzt noch nicht geklärt.

Für das Butenolid von *F. graminearum* wäre ein ähnliches Szenario denkbar. Wie zuvor in dieser Arbeit festgestellt wurde, wird die Butenolidsynthese zwischen 24 und 48 Stunden nach der Inokulation induziert. Außerdem deuten Transkriptomdaten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wilhelm Schäfer (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) darauf hin, dass das Gencluster erst bei der Kolonisierung innerhalb des Pflanzengewebes aktiv ist. Innerhalb des Clusters befindet sich, wie eingangs erwähnt, ein Monocarboxylat-Transporter aus der Familie der „major facilitator superfamily“ (MFS)-Transporter. Neben modifizierenden Enzymen sind Transportergene Bestandteil vieler Sekundärmetabolit-Cluster (Coleman & Mylonakis, 2009) und für die Sekretion der Sekundärmetabolite zuständig. Dass das Butenolid während der Infektion in Pflanzenzellen sekretiert wird, wurde in dieser Arbeit bereits nachgewiesen. Innerhalb der Pflanze könnte es z.B. von Rezeptoren erkannt werden oder Prozesse innerhalb der Pflanze beeinflussen, die daraufhin die Einleitung von Verteidigungsmechanismen initiieren und somit den Pilz an der Infektion hindern, bzw. ihn zu Anfang hemmen. Im ersten Kapitel wurde diskutiert, ob DON als möglicher Induktor des programmierten Zelltods agieren könnte. Die Erkennung von Butenolid und die damit einhergehende Initiierung der pflanzlichen Abwehrmechanismen müsste demnach vorher stattfinden, da abgestorbene Zellen nicht in der Lage wären, die Abwehrmaßnahmen einzuleiten. Welches dieser Metabolite als erstes sekretiert wird wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Sowohl Butenolid, als auch DON konnten 48 Stunden nach der Inokulation nachgewiesen werden. Die Analyse von Zeitpunkten zwischen 24 und 48 Stunden nach der Inokulation könnte Aufschluss darüber geben, welches Metabolit früher sekretiert wird.

Im Verlauf der Evolution hat die Interaktion eines Pathogens mit seinem Wirt dazu geführt, dass sich ein komplexes Arsenal an Virulenzfaktoren von Seiten des Pilzes entwickelt hat um auf die vielseitigen Verteidigungsmaßnahmen des Wirtes zu reagieren (Avirulenzmechanismen). Neben dem Butenolid sekretiert *F. graminearum* Virulenzfaktoren, wie eine sekretierte Lipase (Voigt et al., 2005), Effektoren und Mykotoxine wie z.B. DON (Proctor et al. 1995), die schlussendlich zu einer erfolgreichen Infektion führen und die anfängliche Hemmung durch die Pflanze, bedingt durch die Erkennung von Butenolid, überwinden können.

Diese Hypothese auf die verringerte Virulenz der Komplementationsmutanten angewandt könnte bedeuten, dass diese zu einem früheren Zeitpunkt Butenolid synthetisieren, früher von der Pflanze- indirekt oder direkt- erkannt werden und zunächst in ihrem Infektionsverhalten gehemmt werden. Hierfür müsste eine Zeitreihe von 0 bis 2 Tagen in kleineren Intervallen durchgeführt werden um zu ermitteln, zu welchem genauen Zeitpunkt der Referenzstamm bzw. die Komplementationsmutanten Butenolid synthetisieren und ob sie sich dahingehend unterscheiden. Dass die Mutanten eine veränderte Regulation des Butenolidclusters aufzeigen wurde jedenfalls durch die Expressionsanalyse der Clustergene im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm gezeigt. Das reintegrierte FGSG_08079 Gen wies eine verminderte Expression auf, während die Expression anderer Gene stärker war. Diese veränderte Regulation könnte der ektopischen Integration der Gensequenz geschuldet sein. Es wurde in mehreren Transformationsansätzen versucht, die FGSG_08079 Gensequenz homolog zu reintegrieren. Es konnte hierbei jedoch für keine der getesteten Transformanden

FGSG_08079 Transkript nachgewiesen werden. Da die ektopische Integration den Phänotyp komplementieren konnte und Transkripte nachweisbar waren, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl der Promotor, als auch die Gensequenz keine Fehler enthielten. Durch die Sequenzierung des Plasmids konnte die Richtigkeit der Sequenzen ebenfalls bestätigt werden. Die homologe Integration führt demnach zu einem nicht-funktionalen Promotor. Ob es im Zuge der homologen Rekombination zu einem Sequenzverlust oder einer Sequenzveränderung gekommen ist, müsste durch eine Sequenzierung dieses Sequenzbereiches überprüft werden.

Das Butenolid-Cluster liegt in der subtelomeren Region des Chromosoms 2. Wurde die Gensequenz durch die ektopische Integration in einen Bereich integriert, der einer anderen Regulation unterliegt, so könnte dies zu einer veränderten Induktion und Expressionsrate von FGSG_08079 führen. Bok und Keller (2004) fanden einen nukleären, transkriptionellen Regulator der Sekundärmetabolitsynthese in *Aspergillus nidulans*, LaeA. Die Deletion dieses Regulators führte zur Ausschaltung der Sterigmatocystin (ST)- und Aflatoxinsynthese (AF) in *A. nidulans*. Bok et al. (2006) versuchten daraufhin, die Synthese dieser beiden Sekundärmetabolite durch eine zusätzliche Integration des gemeinsamen Transkriptionsfaktors aflR in der Δ laeA Mutante wiederherzustellen. Die Integration in den nativen Lokus führte nicht zur Synthese von ST und AF. Erst die ektopische Integration von aflR konnte die ST und AF Synthese hervorrufen. Es wurde ebenfalls überprüft, ob die Expression eines Gens des Primärmetabolismus, welches ursprünglich nicht unter der Kontrolle von LaeA steht, in der Δ laeA verändert ist, wenn es aus dem nativen Lokus entfernt und in das Cluster der ST-Synthese integriert wird. Bok et al. konnten nachweisen, dass die Expression dieses Gens, argB, deutlich im Vergleich zum Wildtyp runterreguliert ist. Die Regulation der Genexpression ist demnach abhängig von dessen Lokalisation im Genom.

Die ektopische Integration von FGSG_08079 könnte somit für die verringerte Expression und die Deregulation des Clusters *in planta* verantwortlich sein, welche wiederum zu einer verfrühten Induktion der Butenolid-Synthese führen könnte.

Ein weiterer bereits benannter Virulenzfaktor ist DON. Wie eingangs erwähnt wurde, zeigte die Δ Tri5_GFP Mutante eine deutliche Verringerung der Virulenz. Produzieren die Butenolid-Komplementationsmutanten ebenfalls in der frühen Phase weniger DON als der Referenzstamm könnte dies die anfängliche, langsamere Infektion ebenfalls erklären. Die LC-MS/MS Analyse hat jedoch ergeben, dass die Δ But Mutanten nach fünf Tagen sogar überwiegend mehr DON sekretierten als der Referenzstamm. Dies ist auf das reduzierte Wachstum der Mutanten zurückzuführen. Bei Betrachtung der nicht-normalisierten DON Konzentrationen des 8/1_DsRed und der Δ But Mutanten waren keine erhöhten DON-Konzentrationen für die Mutanten zu beobachten.

Bezieht man die ähnlichen DON Konzentrationen auf eine geringere Menge an gDNA, so resultiert dies in einer höheren Produktion an DON pro kg nachgewiesener gDNA. Dies konnte ebenfalls für die Δ fgl1 Mutante beobachtet werden (Voigt et al., 2007). Die Deletion der Lipase 1 (FgFGL1) in *F. graminearum* führte, im Vergleich zum Wildtyp, zu einer erhöhten Produktion von DON in infizierten Weizenähren zum Zeitpunkt 14 dpi. Gleichzeitig wurde für die Mutante eine reduzierte Virulenz nachgewiesen, da nur inokulierte Ährchen infiziert werden konnten. Auch in diesem Fall wurden ermittelte DON Konzentrationen auf die Menge an gDNA normalisiert. Durch das reduzierte Wachstum im Vergleich zum Wildtyp wurde pro kg Pilzmaterial der Mutante mehr DON produziert.

Die LC-MS/MS Analyse hat gezeigt, dass das geringere Wachstum der Δ But Mutanten nach 5 dpi nicht auf geringe DON-Konzentrationen während der Infektion zurückzuführen ist.

Die Komplementation des Virulenzphänotyps der Δ But Mutanten sollte ebenfalls chemisch erfolgen. Mit dieser Methode kann überprüft werden, ob die fehlende Expression von FGSG_08079 oder doch das Fehlen von Butenolid für diesen Phänotyp verantwortlich ist, da Cytochrom P450 Proteine an mehr als nur einem Syntheseweg beteiligt sein können. Dies wurde von Zhang et al. (2016) gezeigt. Hier beeinflusste die Deletion des Cytochrom P450 Proteins VdCYP1 aus *Verticillium dahliae* die Synthese von 14 Metaboliten im Vergleich zum verwendeten Wildtyp unter Kulturbedingungen.

Die chemische Komplementation ist u.a. möglich, wenn ein ausgeschaltetes Gen innerhalb einer Signalkaskade fungiert und an der Synthese von Signalmolekülen beteiligt ist (Bormann et al., 2014) oder, wie in diesem Fall, für die Synthese eines Metabolits zuständig ist (Seunghoon et al., 2011). Als Kontrolle, ob die externe Butenolidzugabe generell einen Einfluss auf die Infektion hat, wurde der Referenzstamm 8/1_DsRed, neben einer Δ But Mutante, ebenfalls verwendet. 24 Stunden nach der Inokulation der Blüten mit Konidien wurden 10 μ l einer 100 ng/ml Butenolidlösung in die bereits inokulierten Blüten gegeben. Als Kontrolle wurde anstelle von Butenolid steriles H₂O nachinokuliert. Es wurde sowohl eine histologische Untersuchung, als auch eine molekulare Quantifizierung durchgeführt.

Die histologische Untersuchung zeigte, dass die Δ But-3 Mutanten, welche nach 24 Stunden mit Wasser inokuliert wurden, die bereits beobachtete erhöhte Virulenz aufzeigen. Die nachträgliche Inokulation von Butenolid führt dazu, dass sich die Mutanten nach fünf Tagen nur bis zum Rachisknoten ausbreiten. Der Referenzstamm 8/1_DsRed verhält sich unter beiden Bedingungen gleich und kolonisiert die Blüte bis zum Rachisknoten. Die Quantifizierung (s. Abb. 19) ergab, dass es zu einer starken Verringerung des nachgewiesenen Pilzmaterials bei der Δ But-3 Mutante kommt, wenn diese mit Butenolid nachbehandelt wurde. Es konnte sogar weniger gDNA nachgewiesen werden als für den Butenolid-behandelten 8/1_DsRed Stamm. Für letzteren konnte ebenfalls eine Verringerung nachgewiesen werden, wenn Wasser- und Butenolid-Nachbehandlung miteinander verglichen wurden. Unter Verwendung des Student's *t*-Tests ist diese aber nicht signifikant. Die deutliche Verringerung der Mutanten-gDNA beweist, dass der Phänotyp der Deletionsmutanten durch die externe Zugabe von Butenolid komplementiert werden kann.

Dieses Ergebnis klärt die Frage, ob möglicherweise die Deletion des P450 Cytochroms für die erhöhte Virulenz verantwortlich ist. Dies kann nun ausgeschlossen werden, da die Behandlung inokulierter Blüten mit Butenolid den Phänotyp des Referenzstammes wiederherstellen konnte.

Dieses Ergebnis unterstützt zudem die Idee von Butenolid als Avirulenzfaktor, da sowohl der 8/1_DsRed Stamm, als auch die Δ But-3 Mutante ein verringertes Wachstum nach der Butenolidzugabe aufwiesen. Wie zu Anfang gezeigt, wird Butenolid während der Infektion von Weizen zwischen 24 und 48 Stunden nach der Inokulation gebildet. Dieser Zustand wird für die in diesem Experiment verwendeten Wasserkontrollen angenommen. Die nachträgliche Inokulation mit Butenolid für die chemische Komplementation fand allerdings bereits nach 24 Stunden statt, also einem Zeitpunkt, indem die Butenolid-Synthese zwar eingeleitet wurde, aber noch kein Butenolid nachweisbar war. Dies könnte den Einfluss von Butenolid auf die Infektion des Referenzstammes erklären. Durch die frühere Zugabe von

Butenolid werden Abwehrmaßnahmen, bedingt durch die direkte oder indirekte Erkennung des Pilzes, früher eingeleitet, wodurch dieser in der frühen Phase in der Infektion leicht gehemmt wird.

4.5 Die konstitutive Expression von FGSG_08079 führt sowohl zu einer verringerten Butenolid-Synthese als auch zu einer verringerten Virulenz in der frühen Phase der Weizeninfektion

Neben der Erstellung von Butenolid-defizienten Mutanten sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob durch eine Überexpression ausgewählter Gene die Butenolid-Synthese erhöht werden kann. Die konstitutive Expression von Cluster-internen Transkriptionsfaktoren ist eine hierfür schon mehrfach angewandte Methode. Bereits 1997 konnten Flaherty und Payne durch die Fusion des starken und konstitutiven Promotors *gpdA* aus *A. nidulans* an das regulatorische Protein AflR die Aflatoxin Synthese in *Aspergillus flavus* erhöhen. Gleiches wurde für die Synthese von Monacolin K in *Monascus pilosus* durchgeführt (Chen et al., 2010). Die Fusion des *gpdA*-Promotors an den Transkriptionsfaktor *mokH* verstärkte die Monacolin K Synthese um das 1,7-fache im Vergleich zum Wildtyp. Ebenfalls in 2010 konnten Shaaban et al. die Sterigmatocystin-Produktion in *A. nidulans* verstärken. Hierfür wurde ebenfalls der *gpdA*-Promotor an den *bZip* Transkriptionsfaktor, *RsmA*, fusioniert.

Es wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen von Butenolid dazu führt, dass die Mutanten eine erhöhte Virulenz aufzeigen und es wurde diskutiert, ob Butenolid ein Avirulenzfaktor sein könnte. Die Hypothese hinter einer erhöhten Butenolid-Synthese in *F. graminearum* ist folgende: Wenn ein Defizit in der Butenolid-Synthese zu einer erhöhten Virulenz führt könnte die konstitutive und erhöhte Produktion zu einer Verringerung dieser führen.

Um dies zu überprüfen wurde zunächst das Gen FGSG_08080, ein $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ Transkriptionsfaktor, für eine Überexpression in *F. graminearum* ausgewählt. Grund hierfür war zum einen die Beobachtung, dass dieses Gen als erstes exprimiert wird und somit die Expression der anderen Clustergene induzieren könnte (vgl. Abb. 11). Des Weiteren konnten Sieber et al. (2014) zeigen, dass alle Butenolid-Clustergene das Cluster-spezifische Bindemotif 5'-[AT] A [AG] T [GT] [CG] [TA] CCG-3' aufweisen. Dieses kann vom Transkriptionsfaktor erkannt und so die Expression eingeleitet werden. Der Abgleich mit „Jaspar“ (Mathelier et al., 2014) und „Yeasttract“ (Teixeira et al., 2014), Datenbanken für eukaryotische Bindemotive von Transkriptionsfaktoren, hat keine weiteren Transkriptionsfaktoren ergeben, die mit diesem Bindemotif in Zusammenhang gebracht werden können (Sieber et al., 2014).

Als Promotor wurde ebenfalls der *gpdA* verwendet. Das Plasmid wurde sowohl für eine *in locus*, als auch für eine ungerichtete Integration in das Genom vorbereitet und transformiert. Trotz mehrerer Versuche und vieler Transformanden konnte keine Überexpression dieses Gens nachgewiesen werden.

Als zweites Gen wurde FGSG_08079 für eine Überexpression mit Hilfe des *gpdA*-Promotors herangezogen, da es nachgewiesenermaßen an der Butenolid-Synthese beteiligt ist. Mittels Southern Blot und qRT-PCR konnte sowohl die *in locus* Integration, als auch eine sehr stark erhöhte Expression *in vitro* nachgewiesen werden.

Die bis über 200.000-fache Expression des Gens in den Überexpressionsmutanten *in vitro* ist auf eine geringe Transkriptmenge im Referenzstamm unter diesen Bedingungen zurückzuführen (vgl. Anhang 8.1, Abb. 49).

Auch *in planta* konnte eine erhöhte Expression von FGSG_08079 in den Mutanten im Vergleich zum Referenzstamm nachgewiesen werden. Allerdings zeigte die Expressionsanalyse der anderen Clustergene eine deutliche Runterregulation. Mittels LC-MS/MS Analyse wurde daraufhin die Butenolid-Konzentration in infiziertem Pflanzenmaterial überprüft. Es zeigte sich, dass die Überexpressionsmutanten (OE_08079) deutlich weniger Butenolid nach fünf Tagen produzierten als der dazugehörige 8/1_DsRed Stamm. Dies hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf das generelle Infektionsverhalten dieser Mutanten. Nach 21 Tagen zeigten diese das gleiche Schadbild wie der Referenzstamm. Die histologischen Ergebnisse zeigten ebenfalls keine sichtbaren Veränderungen. Erst die Quantifizierung des Pilzmaterials innerhalb des infizierten Pflanzengewebes zeigte eine deutliche Reduktion nach fünf Tagen. Die OE_08079 Mutanten wiesen, wie die zuvor beschriebenen Komplementationsmutanten, eine verringerte Virulenz in der frühen Infektionsphase auf. Allerdings unterscheiden sich diese in vielerlei Hinsicht: Während die KΔBut Mutanten eine ektopische FGSG_08079 Integration, eine verringerte Genexpression, eine teilweise veränderte Clusterexpression und Referenzstamm ähnliche Butenolidkonzentrationen aufwiesen besaßen die OE_08079 Mutanten eine konstitutive Expression des *in locus* integrierten Gens. Außerdem waren fast alle Clustergene signifikant im Vergleich zum 8/1_DsRed Stamm runterreguliert und die Butenolidsynthese stark reduziert.

Takaoka et al. (2014) analysierten die Regulation der AK-Toxinsynthese des Birnen-Pathotypen von *Alternaria alternata* anhand der Deletion und Überexpression einer Cytochrom P450 Monooxygenase, AKT7 (AK-Toxin Gen 2). Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion dieses Gens zu einer deutlichen Überproduktion des AK-Toxins *in vitro* führte. Die Virulenz war unverändert. Bei der Untersuchung der Überexpressionsmutanten konnte festgestellt werden, dass diese hingegen sowohl weniger Toxin *in vitro* bildeten, als auch deutlich weniger Läsionen auf Wirtspflanzen auslösten als der dazugehörige Wildtyp. Der Cytochrom P450 Monooxygenase wurde daher die Rolle eines negativen Regulators der AK-Toxinsynthese zugesprochen. Es wurde diskutiert, ob die Umsetzung einer Vorstufe des AK-Toxins durch AKT7 zu einem unbekannten Produkt diese Verringerung des Endproduktes hervorruft.

Der genaue Syntheseweg für Butenolid ist bis jetzt noch nicht bekannt. Folgerichtig ist die genaue Funktion von FGSG_08079 innerhalb der Butenolidsynthese ebenfalls noch nicht genauer beschrieben worden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich ebenfalls um einen negativen Regulator handelt, da dessen Deletion die Butenolidsynthese unterbindet. Denkbar wäre jedoch, dass FGSG_08079 für die Bildung einer Vorstufe, oder gar des ersten Produktes auf dem Weg zum Butenolid, wichtig ist. Hierbei könnte die erhöhte Expression dazu führen, dass dieses Produkt akkumuliert, oder sogar früher synthetisiert wird. Führt die erhöhte Konzentration der Vorstufe zu einem negativen Feedback-Loop, wird die Expression der Clustergene gehemmt und damit die Butenolidsynthese reduziert. Für die Komplementationsmutanten wurde eine verfrühte Butenolidsynthese durch die ektopische Integration von FGSG_08079 diskutiert. Fungiert Butenolid als Avirulenzfaktor kann die Pflanze Abwehrmaßnahmen früher einleiten und die initiale Ausbreitung zunächst hemmen. Dies könnte ebenfalls für die Überexpressionsmutanten zutreffen. Die

möglicherweise verfrühte Produktion einer Vorstufe des Butenolids könnte zur ebenfalls früheren Butenolidsynthese führen, wodurch die Mutanten ebenfalls früher als der 8/1_DsRed Stamm von der Pflanze erkannt und an der weiteren Ausbreitung gehindert werden.

Bei den Überexpressionsmutanten handelt es sich um die Überexpression eines Cytochrom P450 Proteins. Die meisten Cytochrom P450 Proteine gehören zu den Monooxygenasen, die ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff auf ein Substrat übertragen, während das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird. Die Reaktionen, die von Cytochrom P450 Enzymen ausgeführt werden, sind sehr divers. So sind beispielsweise in *Nectria haematococca* Cytochrom P450 an der Demethylierung von Pisatin, einem Phytoalexin, beteiligt (Weltring et al., 1988). *F. oxysporum* ist in der Lage, durch diese Enzyme Stickoxide zu reduzieren (Shoun & Tanimoto, 1999). Weiterhin ist ein anderes Cytochrom P450 in *F. oxysporum* für die Hydroxylierung von Fettsäuren zuständig (Nakayama et al., 1996). Dass FGSG_08079 an der Synthese von anderen Sekundärmetaboliten beteiligt ist, ist ebenfalls möglich und konnte für *Verticillium dahliae* nachgewiesen werden (Zhang et al., 2006). Die Deletion eines Cytochrom P450 führte zur Veränderung des metabolischen Profils unter Kulturbedingungen für die Mutanten. Dass eine Überexpression von FGSG_08079 dieses in *F. graminearum* ebenfalls beeinflusst ist aus diesem Grunde denkbar. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von FGSG_08079 zu generellen oder metabolischen Veränderungen während der Infektion in Bezug auf die Virulenz führt und die beobachteten Phänotypen darauf zurückzuführen sind.

Für die Überexpressionsmutanten wurde ebenfalls die *in planta* DON-Synthese überprüft. Die Mutanten waren in der Lage, DON im gleichen Maß zu synthetisieren wie der 8/1_DsRed Stamm. Folglich kann bei den OE_08079 Mutanten die verringerte Virulenz ebenfalls nicht auf eine geringere DON-Produktion zurückgeführt werden.

Die Analysen der FGSG_08079 Überexpression haben ergeben, dass die erhöhte *in locus* Expression zu einer Deregulation des Butenolid-Clusters *in planta* führt. Diese könnte der Grund für die beobachtete, verringerte Butenolid-Synthese und die reduzierte Virulenz in der frühen Infektionsphase sein. Dass hierbei Butenolid in der Funktion eines Avirulenzfaktors zu einem früheren Zeitpunkt synthetisiert wird und deshalb früher von der Pflanze erkannt wird ist vorstellbar und müsste näher untersucht werden. Weiterhin wäre es möglich, dass die Überexpression des Cytochrom P450 generelle Veränderungen im Metabolismus von *F. graminearum* hervorruft die für die beobachteten Phänotypen verantwortlich sind.

4.6 Die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid führt zu einer Reduktion der Virulenz von *F. graminearum* auf Weizen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die mögliche Rolle des Butenolids während der frühen Phase der Weizeninfektion von *F. graminearum* diskutiert. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass Butenolid-defiziente Mutanten virulenter sind als der Referenzstamm und, dass die chemische Komplementation dieser Mutanten durch die spätere, externe Zugabe von Butenolid die Virulenz des Referenzstammes wiederherstellt. Des Weiteren konnte

sowohl für die Komplementation-, als auch für die Überexpressionsmutanten Virulenzverringerungen in der frühen Phase der Infektion nachgewiesen werden, obwohl jede dieser Mutanten in der Lage war Butenolid herzustellen.

Eine mögliche Erklärung war, wie schon zuvor erwähnt, die Möglichkeit einer früheren Induktion der Butenolidsynthese für Komplementations- und Überexpressionsmutanten. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Behandlung von Weizenblüten mit Butenolid 24 Stunden vor der Inokulation mit Konidien des Referenzstammes einen Einfluss auf die Infektion hat. Małolepsza (2006) konnte eine erhöhte Resistenz von Tomatenpflanzen gegenüber *B. cinerea* induzieren, wenn die Pflanzen mit o-Hydroxyethylorutin oder Acibenzolar-S-methyl, einem bekannten Aktivator der pflanzlichen Abwehr, 24 Stunden vor der Inokulation behandelt wurden. Die *B. cinerea* Infektion wurde dadurch gehemmt. Des Weiteren konnte die externe Zugabe von Melatonin, einem Pflanzenhormon, vor der Inokulation von Apfelblättern mit dem Pilz *Diplocarpon mali* die Resistenz des Wirtes erhöhen (Yin et al., 2012). Die Vorbehandlung von Pflanzen, um mögliche Induktoren der pflanzlichen Abwehr zu entschlüsseln, ist daher eine bereits angewandte Methode.

Die Vorbehandlung von Weizenblüten mit Butenolid (10 µl, 50 ng/ml) erfolgte 24 Stunden vor der Inokulation mit Konidien des Referenzstammes. Die Ernte der Ähren erfolgte fünf Tage nach der Inokulation mit Konidien. Als Kontrolle wurden Weizenblüten mit sterilem H₂O vorbehandelt.

Interessanterweise führte die Vorbehandlung der Weizenblüten mit Butenolid tatsächlich zu einer deutlichen Verringerung des Pilzwachstums während der Infektion (s. Abb. 34). Dieses Ergebnis verstärkt die Hypothese, dass das von *F. graminearum* synthetisierte Butenolid als Avirulenzfaktor fungieren könnte. Durch die Butenolid-Behandlung könnten pflanzliche Verteidigungsmechanismen induziert worden sein, die möglicherweise die initiale Infektion hemmen.

4.7 Die Produktion von DON und Butenolid unter Kulturbedingungen unterscheidet sich von der Produktion während der Weizeninfektion

Während der Infektion von Pflanzen durch phytopathogene Pilze kommt es zur Synthese und Sekretion von einer Reihe von Sekundärmetaboliten (Shwab & Keller, 2008). Welche Faktoren zu deren Induktion *in planta* führen ist bisher jedoch nicht bekannt. Unter Laborbedingungen konnte jedoch für *F. graminearum* gezeigt werden, dass Stickstoff-limitierende Bedingungen die Induktion der DON- und der Butenolid-Synthese einleiten (Miller & Blackwell, 1986). Des Weiteren kann die DON-Synthese unter Verwendung eines Minimalmediums und der Zugabe von (NH₄)₂SO₄ (Covarelli et al. 2004, Ilgen et al. 2009) eingeleitet werden. Hier zeigte sich, dass das Absinken des pH-Wertes im Medium für die Induktion der DON-Synthese verantwortlich ist. Durch das Versetzen des Mediums mit (NH₄)₂HPO₄ (Harris et al., 2006) kann sowohl die DON, als auch die Butenolid-Synthese induziert werden.

In vorherigen Kapiteln wurde mittels LC-MS/MS die Fähigkeit aller erstellten Mutanten überprüft, ob sie während der Infektion DON und Butenolid synthetisieren können. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es keinen Zusammenhang zwischen fehlender oder reduzierter Butenolid-Synthese und der DON-Synthese gibt. ΔBut Mutanten, die kein Butenolid mehr produzierten, wiesen ähnliche DON-Konzentrationen auf wie der Referenzstamm. Die

Überexpressionsmutanten, die deutlich weniger Butenolid während der Infektion produzierten, zeigten ebenfalls keine signifikant veränderten DON-Konzentrationen im Vergleich zum Referenzstamm.

Um die *in vitro* Situation zu überprüfen, wurde nach Harris et al. (2006) sowohl die DON, als auch die Butenolid-Synthese induziert und mittels LC-MS/MS die Überstände analysiert. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das verwendete Medium nicht optimal für die Induktion der Butenolid-Synthese war, da die ermittelten Konzentrationen teilweise sehr gering und nur knapp über der Nachweisgrenze lagen. Für diese Vermutung sprechen folgende Beobachtungen:

Es konnte für die Δ But-2 und -3 Mutante Butenolid nachgewiesen werden. Die Butenolid-Bestimmung *in planta* wurde ebenfalls für die Δ But-3 Mutante durchgeführt und resultierte in einem Fehlen von Butenolid. Demzufolge ist diese Mutante nicht fähig Butenolid zu produzieren. Zwar zeigte der Southern Blot für Δ But-2 nicht das erwartete Fragment, jedoch konnte ebenfalls kein Wildtyp-Fragment nachgewiesen werden.

Des Weiteren zeigen alle drei Deletionsmutanten den gleichen Phänotypen. Betrachtete man sich die Butenolid-Konzentrationen der anderen Stämme (8/1_DsRed, K Δ But, OE_08079) so konnten erhebliche Schwankungen innerhalb der jeweiligen biologischen Replikate festgestellt werden. Aus je einem biologischen Replikat wurde zu den Zeitpunkten 3, 4 und 6 dpi Medium/Myzel Gemisch entnommen und nach der Abtrennung des Myzels bei -20 °C gelagert. Auffallend ist, dass es zu teilweise drastischen Verringerungen des gemessenen Butenolids nach vier bzw. sechs Tagen kam. Dies wurde ebenfalls, jedoch seltener, bei den DON-Konzentrationen in den Kulturüberständen beobachtet.

Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Messfehler oder um ein nicht funktionierendes LC-MS/MS System handelt. Für die Analysen wurde ein interner Standard verwendet. Ein interner Standard ist eine probenfremde Komponente, die dem Analyten meist chemisch ähnlich, aber nicht mit ihm identisch ist. Durch seine Verwendung in einer definierten Konzentration kann überprüft werden, ob es zu Verlusten oder Messschwierigkeiten während der LC-MS/MS Analyse kommt. Im Falle von Butenolid wurde L-Butenolid als interner Standard verwendet und den zu analysierenden Überständen zugesetzt. Da keine erwähnenswerten Abweichungen des internen Standards beobachtet werden konnten, kann aus diesem Grund ein Messfehler ausgeschlossen werden. Eine Wiederholung dieses Experimentes könnte helfen, diese Annahme zu bestätigen.

Die ermittelten DON-Konzentrationen zeigten ebenfalls Schwankungen innerhalb der biologischen Replikate auf. Anders als beim Butenolid, konnten für die DON-defiziente Mutante Δ Tri5_GFP nur sehr geringe, vernachlässigbare DON-Konzentrationen gemessen werden. Es fiel auf, dass die Deletionsmutanten Δ But-1 bis -3 im Mittel eine höhere DON Produktion aufzeigten als der Referenzstamm, wohingegen die Komplementation zu teilweise ähnlichen, teilweise niedrigeren DON-Konzentrationen *in vitro* führte. Dagegen produzierten die OE_08079 Mutanten -1 bis -3 eher niedrigere DON Konzentrationen. Harris et al. (2006) haben beobachtet, dass die ermittelten Butenolid und 15-ADON Konzentrationen *in vitro* immer gegensätzlich waren. Bei erhöhter 15-ADON Synthese wurde weniger, bei verringerter 15-ADON Synthese mehr Butenolid nachgewiesen. Da die in dieser Arbeit durchgeführte Butenolid-Bestimmung kein eindeutiges Ergebnis lieferte, ist eine Aussage darüber, ob diese Gegensätzlichkeit zutrifft, nicht möglich. Betrachtet man sich jedoch ausschließlich die DON Werte, so kann *in vitro* in Butenolid-defizienten

Mutanten eine erhöhte DON Produktion nachgewiesen werden. Somit unterscheidet sich die *in vitro* Synthese von der *in planta* Synthese, da die Δ But-Mutanten während der Infektion keine erhöhte DON Synthese im Vergleich zum 8/1_DsRed aufzeigten. Diese Ergebnisse zeigen, dass, zumindest für die DON-Synthese, Unterschiede in der Induktion vorliegen. Die Synthese von Sekundärmetaboliten kann durch Signale oder Substrate des Wirtes reguliert werden. Für die Synthese von Sterigmatocystin und Aflatoxin benötigen einige *Aspergillus*-Arten Acetyl-CoA, welches z.B. aus Fettsäuren befallener Maiskörner stammt (Maggio-Hall et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das pflanzliche Polysaccharid Amylopektin die Fumonisin B₁ Synthese in *Fusarium verticillioides* während der Infektion von Maizkörnern induziert (Bluhm & Woloshuk, 2005). Die beobachteten Unterschiede in der *in vitro* und *in planta* DON Synthese der Δ But-Mutanten im Vergleich zum Referenzstamm könnte demnach auf eine veränderte Induktion zurückzuführen sein.

4.8 Butenolid beeinflusst die nicht-mitochondriale Atmung in Weizenvorspelzen

Die Identifizierung von Sekundärmetaboliten in Pilzen und die damit einhergehende Untersuchung ihrer Wirkungsweise auf die Pflanzenzelle führt dazu, dass teilweise die Angriffsziele dieser Metabolite entschlüsselt wurden. Ein häufiges Ziel pilzlicher Sekundärmetabolite sind Chloroplasten, wie es z.B. für das Tetrapeptid Tentoxin gezeigt wurde. Dieses von *Alternaria* spp. synthetisierte Toxin inhibiert die F₁-ATPase von Chloroplasten (Meiss et al., 2008). Aber auch die Plasmamembran kann von einigen sekundären Stoffwechselprodukten beeinflusst werden. Das Polyketid Beticolin, synthetisiert von *Cercospora beticola*, formt Kanäle innerhalb der Plasmamembran, was zu Veränderungen der Permeabilität und der Ionen-Durchlässigkeit führt (Goudet et al., 2000). Ein weiteres, häufiges Ziel von Sekundärmetaboliten sind die Mitochondrien. Das von *C. heterostrophus* produzierte, wirts-spezifische T-Toxin formt Poren innerhalb der Mitochondrienmembran, indem es mit einem Mitochondrien-spezifischen Protein, URF13, interagiert (Walton, 1996).

In wie weit das von *F. graminearum* produzierte Sekundärmetabolit Butenolid die Pflanze beeinflusst ist bisher noch nicht bekannt. Wegen dessen möglichen Beziehung zur Kashin-Beck Krankheit, eine sich auf Gelenke und Knochenapparat auswirkende Erkrankung (Feng et al., 1987), wurde die Wirkung von Butenolid auf Erythrozytenmembranen und Myokard-Mitochondrien untersucht. Es zeigte sich, dass Butenolid sowohl zur Lipidperoxidation der Erythrozyten- als auch der Mitochondrienmembran führt und somit sowohl die Funktion membrangebundener Proteine, als auch die Aktivität von Mitochondrien beeinflusst (Wang et al., 2007; 2009). Weiterhin konnten Wang et al. (2009) zeigen, dass in Myokard-Mitochondrien das Membranpotenzial erheblich verringert wurde. Dies kann auf eine Dysfunktion der mitochondrialen ATP-Synthase zurückzuführen sein, wodurch die Synthese von ATP ausbleibt.

Für die Untersuchung der Wirkungsweise von Butenolid auf pflanzliche Mitochondrien wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, engl. oxygen consumption rate) von Weizenvorspelzen bestimmt, die unterschiedliche Inkubationszeiten (30, 60, 180 Min.) mit 80 µg/ml Butenolid durchliefen. Während der OCR-Messung wurden zu festgelegten Zeitpunkten spezifische Inhibitoren der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette hinzugegeben, wodurch die Effizienz der einzelnen Komplexe bestimmt werden kann.

Betrachtete man sich nun die Ergebnisse der OCR-Messungen mit Butenolid behandelten und unbehandelten Spelzen fällt auf, dass es bei der basalen Respiration keine Unterschiede gab. Allerdings konnte anhand des Kurvenverlaufs beobachtet werden, dass die Zugabe von Oligomycin nur zu einem sehr schwachen Abfall der OCR für die behandelten Spelzen führte. Die unbehandelten Kontrollspelzen wiesen eine stärkere Abnahme der OCR auf (Abb. 25). Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase der Mitochondrien. Berechnete man nun die ATP-gekoppelte Respiration (Abb. 27) zeigte sich eine deutliche und signifikante Verringerung der ATP-gekoppelten Respiration in behandelten Spelzen für alle getesteten Inkubationszeiten. Die ATP-Synthase wird durch den Rückstrom von Protonen in die Mitochondrienmatrix angetrieben. Allerdings ist die ATP-Synthase als einziger Komplex der mitochondrialen Atmungskette in der Lage, Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix des Mitochondriums zurückzuführen. Die Komplexe I, III und IV translozieren dann die vorhandenen Protonen in den Intermembranraum, wodurch der Elektronentransport und die Reduktion von O_2 zu H_2O weiterhin gewährleistet wird. Da jedoch durch eine Oligomycin Behandlung keine Protonen durch die ATP-Synthase zurückgeführt werden können, wird der Elektronentransport und der damit verbundene Sauerstoffverbrauch reduziert. Diese Reduktion des Sauerstoffverbrauches konnte für die Kontrollspelzen beobachtet werden: Die ATP-Synthase wird inhibiert, der Protonen-Rückstrom bleibt aus und der Sauerstoffverbrauch sinkt. Bei den Butenolid-behandelten Spelzen sinkt der Sauerstoffverbrauch jedoch nicht in dem Maße wie in der Kontrolle. Es können alle Redoxreaktionen stattfinden. Der Elektronenfluss wird nicht durch den fehlenden Protonen-Rückstrom, bedingt durch die Inhibierung der ATP-Synthase, beeinflusst.

Dies könnte auf einen ungehinderten Einstrom an Protonen in die Matrix und somit auf die Entkopplung der ATP-Synthese vom Protoneneinstrom zurückzuführen sein. Die Protonendurchlässigkeit müsste also bei den Butenolid-behandelten Spelzen im Vergleich zur Kontrolle erhöht sein. Tatsächlich hat die Berechnung der Protonendurchlässigkeit jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergeben (s. Abb. 27).

Betrachtet man die zwei Aspekte der basalen Atmung, die nicht-mitochondriale und die mitochondriale Respiration, so waren bei der mitochondrialen Respiration (MR) ebenfalls keine Unterschiede messbar. Anders verhielt es sich mit der nicht-mitochondrialen Respiration (NMR). Hier konnte eine signifikante Erhöhung der NMR bei Spelzen beobachtet werden, die vor der Messung für 30 bzw. 60 Minuten mit Butenolid inkubiert wurden (Abb. 26). Bei gleichbleibender basaler Atmung und erhöhter NMR hätte eine Verringerung in der MR festgestellt werden müssen, da sich die basale Atmung aus der NMR und der MR zusammensetzt. Im Mittel liegen die Messwerte der OCR tatsächlich unterhalb der Kontrolle. Durch die große Streuung innerhalb der biologischen Replikate kann allerdings keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Die Durchführung von weiteren Messungen oder die Verwendung einer höheren Butenolid-Konzentration könnte zu einem eindeutigeren Ergebnis führen.

Als letzten Aspekt der mitochondrialen Atmung wurde die maximale Respiration näher betrachtet. Durch die Zugabe von FCCP wird die Mitochondrienmembran durchlässiger für Protonen, wodurch alle Redoxreaktionen unabhängig von verfügbaren Protonen stattfinden können. Auch hier zeigt sich im Mittel wieder eine Verringerung der maximalen Respiration in Butenolid-behandelten Spelzen im Vergleich zur Kontrolle. Doch die wiederholt großen Abweichungen innerhalb der biologischen Replikate machen eine genaue Aussage

unmöglich. Spelzen, die 180 Minuten mit Butenolid behandelt wurden, zeigten eine signifikante Abnahme in der maximalen Respiration.

Was dieses Experiment auf jeden Fall deutlich gezeigt hat ist, dass die ATP-gekoppelte Respiration Butenolid-behandelter Spelzen deutlich verringert ist. Der Sauerstoffverbrauch sinkt im Zuge der Inhibierung der ATP-Synthase nicht und O_2 kann ungehindert weiter zu H_2O reduziert werden. Des Weiteren ist die nicht-mitochondriale Atmung, etwa durch andere Oxidationsprozesse, im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

Eine mögliche Erklärung für sowohl den erhöhten Sauerstoffverbrauch, trotz Inhibierung der ATP-Synthase, als auch der erhöhten NMR in Butenolid-behandelten Spelzen könnte die Aktivität einer alternativen Oxidase (AOX) innerhalb der Mitochondrien sein. AOX ist ein integrales Membranenzym in der inneren Mitochondrienmembran von Pflanzen, das dem Komplex III vorgeschaltet ist und die Reduktion von Ubichinon direkt an die Reduktion von O_2 zu H_2O koppelt. Der Elektronenfluss von Komplex I über Ubichinon zu den Komplexen III und IV bleibt ebenso aus wie die Reduktion von O_2 zu H_2O an Komplex IV. Es werden außerdem durch die Aktivität der AOX weniger Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Da durch die AOX ebenfalls keine Protonen in den Intermembranraum transloziert werden, verringert sich die zuvor benannte protonenmotorische Kraft. Die ATP-Synthese bleibt aus (Vanlerberghe, 2013).

Auf die erhaltenen Ergebnisse bezogen könnte eine Butenolid-Behandlung dazu führen, dass die AOX Aktivität induziert und dadurch der Antrieb der ATP-Synthase und der damit einhergehende Protonenrückfluss unterbunden wird. Da trotzdem weiterhin O_2 zu H_2O durch AOX reduziert wird sinkt der Sauerstoffverbrauch nicht in dem Maße wie in der Kontrolle. Dieser Weg der Sauerstoffreduktion ist ein alternativer, nicht-mitochondrialer Weg, weshalb eine Erhöhung eben jener NMR gemessen werden konnte. Allerdings sind unter diesen Bedingungen die zur Verfügung stehenden Protonen begrenzt, wodurch sich die maximal mögliche Respiration verringert.

Wie Butenolid die AOX-Expression induzieren könnte bleibt ungeklärt. Es sind sehr viele Möglichkeiten beschrieben worden die zu einer Induktion dieser Aktivität führen (s. dazu Vanlerberghe, 1997; 2013). Die vielen Studien haben jedoch ein generelles Muster ergeben: Die Inhibierung bzw. Dysfunktion einzelner Komplexe der mitochondrialen Atmung führt zum Beispiel zur Induktion der AOX Aktivität (Vanlerberghe et al. 1996; Karpova et al., 2002; Juszczuk et al. 2012). Hiernach könnte z.B. der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor Antimycin zur AOX Induktion führen (Vanlerberghe et al. 1994). Dies hätte sich jedoch sowohl auf die Kontrolle, als auch auf die Butenolid-behandelten Spelzen ausgewirkt und kann somit ausgeschlossen werden.

Doch eine Interaktion von Butenolid mit einem mitochondrialen Protein oder gar einem Komplex der Atmungskette ist ebenfalls möglich und wurde für das T-Toxin aus *C. heterostrophus* gezeigt (Walton, 1996). Die AOX Expression scheint jedoch auch über reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. Reactive Oxygen Species) induziert zu werden. Vanlerberghe et al. (1996) und Ho et al. (2008) konnten zeigen, dass die externe Zugabe von ROS die AOX Expression induzieren kann. Gleiches konnten Maxwell et al. (2002) in Tabakzellen nachweisen. Die Behandlung dieser Zellen mit entweder H_2O_2 oder Salicylsäure führte sowohl zu einer starken Expression der AOX1, als auch zu einer erhöhten Expression von Genen, die bekannt dafür sind, dass sie durch Prozesse wie Seneszenz oder Pathogenbefall induziert werden. Interessanterweise wird die Induktion dieser Gene durch eine Vorbehandlung mit Bongkreksäure unterbunden. Die Bongkreksäure ist ein

Atmungsinhibitor, welcher die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore schließt und somit sowohl den Ein- als auch den Ausstrom von Proteinen, Protonen etc. aus dem Mitochondrium unterbindet. Dass dadurch die Induktion der Genexpression im Zellkern unterbunden wird deutet darauf hin, dass Mitochondrien als Signalgeber unter Stressbedingungen fungieren können. Dies wurde auch von Gleason et al. (2011) und He et al. (2012) gezeigt.

Auf das Butenolid bezogen wurde von Wang et al. (2006) nachgewiesen, dass dieses Sekundärmetabolit zu einem Konzentrations-abhängigen Anstieg von ROS in HepG2 Zellen führt. Dass Butenolid zur Generierung von ROS führt könnte auch die Erklärung für die beobachtete Lipidperoxidation in Erythrozyten sein (Wang et al. 2007). Wie es zu der erhöhten Produktion von ROS kommt ist bisher noch nicht geklärt.

Auf die Wirkung von Butenolid auf pflanzliche Mitochondrien bezogen könnte eine weitere Erklärung sein, dass die Generierung von ROS in den Mitochondrien zu einer Signalkaskade führt, in der die Expression der AOX induziert wird. Dass Butenolid zu einer erhöhten ROS Produktion in Vorspelzen führt konnte in dieser Arbeit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die NBT-Färbung behandelter Spelzen zur Detektion von O_2^- führte zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen, da kein Unterschied zwischen diesen und der Kontrollen beobachtet werden konnte. Die Verwendung von Diaminobenzidin (DAB) zur Detektion von H_2O_2 könnte Aufschluss darüber geben, ob eine Butenolid-Behandlung zur Induktion der H_2O_2 Produktion führt.

Man kann sich jedoch ebenfalls einen Wirkort für das Butenolid vorstellen, der nur indirekt mit den Mitochondrien und der AOX-Induktion, aber direkt mit einer erhöhten ROS-Produktion zu tun haben könnte. Die AOX ist ein Homodimer und besitzt am N-Terminus konservierte Cysteine. Diese sind in der Lage, eine kovalente Bindung einzugehen, wenn es zur Oxidation kommt. In dieser Form ist das Enzym inaktiv. Die Reduktion dieser Bindung und die damit einhergehende Aktivierung des Enzyms kann z.B. durch die Oxidation spezifischer Substrate aus dem Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus, engl. *tricarboxylic acid*), wie Isocitrat oder Malat, eingeleitet werden (Vanlerberghe et al. 1995). Demnach könnte die ROS-Produktion auch zur Oxidation von Substraten des TCA-Zyklus führen welche somit die AOX-Aktivierung einleiten.

Im Zusammenhang mit der festgestellten, erhöhten Virulenz in der frühen Infektionsphase Butenolid-defizienter Mutanten und der Hypothese, dass es sich bei diesem Metaboliten um einen Avirulenzfaktor handelt, könnten die Mitochondrien, direkt oder indirekt, ein mögliches Target darstellen. Indem die Mitochondrien, bzw. die mitochondriale Atmung, beeinflusst wird könnten so Signale an den Nukleus der Pflanzenzelle gesendet und Abwehrmaßnahmen eingeleitet werden. Durch das Fehlen von Butenolid bleibt dieses erste Signal und die damit verbundenen Maßnahmen aus und der Pilz kann zu Beginn das pflanzliche Gewebe schneller kolonisieren.

Als weiterer Versuchsansatz wurde überprüft, ob die festgestellte Wirkung von Butenolid auf Pflanzenmitochondrien ebenfalls während der Infektion beobachtet werden konnte. Um sicherzustellen, dass mögliche Einflüsse tatsächlich auf die Synthese von Butenolid zurückzuführen sind, wurde neben dem 8/1_DsRed Stamm, der nachgewiesenermaßen Butenolid während der Infektion produziert, die Δ But-3 Mutante für die Inokulation verwendet. Letztere ist nicht in der Lage Butenolid zu synthetisieren.

Es wurden Vorspelzen mit Konidien des jeweiligen Stammes bzw. sterilem H₂O inokuliert und 6 Tage inkubiert. Die Vorbereitung der Spelzen für die OCR-Messung erfolgte wie zuvor beschrieben. Die einzige Ausnahme war, dass kein synthetisches Butenolid dem Assaymedium zugesetzt wurde.

Betrachtet man sich zunächst die Ergebnisse der Wasserkontrolle fällt auf, dass sich diese nach der Zugabe von Oligomycin anders verhält als die unbehandelten Spelzen im Vorversuch. Der erwartete Abfall der OCR durch die Inhibierung der ATP-Synthase bleibt aus. Dies spiegelt sich auch in der Berechnung der ATP-gekoppelten Respiration wieder, welche sehr niedrig ist. Ebenso verhält es sich bei den Vorspelzen, die mit einem der Pilzstämme infiziert waren. Außerdem konnte kein Unterschied zwischen dem 8/1_DsRed Stamm und der Mutante beobachtet werden. Dieses Ergebnis zieht sich durch alle betrachteten Aspekte der mitochondrialen Atmung.

Eine Frage, die es zu beantworten gilt, ist, warum sich die Kontrollspelzen aus beiden Experimenten unterschiedlich verhielten. Hier könnte ein Grund das Alter sein. Während die unbehandelten Spelzen aus Experiment I mit dem Metabolit lediglich zwei Tage- bedingt durch den Transport zum Messort- auf Wasseragar auslagen, lag die Inkubationsdauer der Spelzen aus Experiment II bei insgesamt 6 Tagen und einer durchschnittlichen Temperatur von ca. 20 °C. In einem der ersten Experimente wurde überprüft, wie sich die Lagerdauer bei 4 °C auf die OCR auswirkt (s. Anhang 8.4, Abb. 57). Ein Unterschied von 6 Tagen bei einer Lagerung bei 4 °C reduzierte die OCR um ungefähr 1/3. Dass die Lagerung, bzw. Inkubation für 6 Tage bei ca. 20 °C ebenfalls zu einer Veränderung der OCR führt kann folglich angenommen werden.

Des Weiteren konnten keine Unterschiede zwischen der 8/1_DsRed und der ΔBut-3 Infektion beobachtet werden. Möglicherweise ist auch hier das Alter der Spelzen dafür verantwortlich, dass der Einfluss von Butenolid nicht messbar war. Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, dass Butenolid tatsächlich innerhalb der 6 Tage produziert worden ist. Die dazugehörige LC-MS/MS Analyse ergab keine nachsollziehbaren Ergebnisse. Eine differentielle Analyse des Transkriptoms von Laufhyphen und Infektionskissen von *F. graminearum* ergab, dass das Cluster für die Butenolidsynthese in keiner der beiden Strukturen aktiv ist. Allerdings zeigten Transkriptomdaten des Pilzes innerhalb des Pflanzengewebes Transkripte für sieben der acht Clustergene (unveröffentlichte Daten, Michael Mentges, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg). Dies bedeutet, dass die Butenolid-Synthese erst innerhalb der Pflanze, und nicht schon bei der Kolonisierung oder Penetration, induziert wird. Das Fehlen von Butenolid in infizierten Vorspelzen könnte demnach darauf zurückzuführen sein, dass der Pilz zu dem analysierten Zeitpunkt von 6 Tagen das Pflanzengewebe noch nicht kolonisiert hat.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Butenolid die nicht-mitochondriale Atmung, möglicherweise durch die indirekte oder direkte Induktion einer alternativen Oxidase, erhöht. Womit Butenolid interagiert und diese Veränderungen verursacht bleibt ungeklärt.

4.9 Butenolid beeinflusst sowohl das Wachstum von Bakterien und filamentösen Pilzen *in vitro* als auch die Regeneration von *F. graminearum* Protoplasten

In vorherigen Kapiteln wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Butenolid von *F. graminearum* in der frühen Infektionsphase von Weizen als Avirulenzfaktor fungiert und die Induktion einer alternativen Oxidase in Mitochondrien von Weizenvorspelzen einleitet. Neben dem Aspekt der Pflanzeninfektion wurde ebenfalls die Bioaktivität des Butenolids näher betrachtet. Die Beschaffung und Aufnahme von Nährstoffen ist verbunden mit einem Konkurrenzkampf mit anderen Mikroorganismen, seien es Pilze oder Bakterien. So könnten sekretierte Sekundärmetabolite ebenfalls dazu beitragen, dass Antagonisten im Wachstum gehemmt werden. Für die Überprüfung, wie sich Butenolid auf das Wachstum von Bakterien, Hefen und phytopathogenen Pilzen auswirkt, wurden Wachstumsassays mit 80 µg/ml Butenolid im Medium durchgeführt. Als Kontrolle wurde steriles H₂O zugesetzt. Für die Bakterien und Hefen wurde nach 18 Stunden Inkubation die OD₅₉₅, für die Phytopathogene nach 24 und 48 Stunden die GFP Fluoreszenz, bestimmt.

Interessanterweise konnten alle gram-negativen und nur ein gram-positives Bakterium im Wachstum gehemmt werden. Die getesteten Hefen wurden nicht beeinflusst. Worin besteht nun die hemmende Wirkung von Butenolid auf Bakterien? Betrachtet man sich die Strukturformel von Butenolid (s. Abb. 47) so kann ein Lacton-Ring ausgemacht werden. Die Struktur des Butenolids ähnelt dem der *N*-Acylhomoserin-Lactone (*N*-HSL) (s. Abb. 47), Moleküle, die gram-negative Bakterien für das Quorum-sensing verwenden. Durch Quorum-sensing sind Bakterien in der Lage, die Genexpression innerhalb einer Population zu regulieren und der Zelldichte anzupassen. Mit steigender Zelldichte steigt die Konzentration dieser sekretierten Moleküle, so genannte Autoinducer (AI). Diese hohe AI-Konzentration wird von den Bakterienzellen mit spezifischen Rezeptoren erkannt und die entsprechende Genexpression eingeleitet. Auf diese Weise können Prozesse wie z.B. Virulenz bei pathogenen Bakterien, Antibiotika-Synthese oder Biofilmbildung reguliert werden (Miller & Bassler, 2001). Es scheint also möglich, dass das Butenolid, obwohl geringe strukturelle Unterschiede bestehen, als AI fungiert und somit den Bakterienzellen vorgibt eine gewissen Zelldichte erreicht zu haben, woraufhin kein weiteres Wachstum erfolgt. Hierbei gilt es zu beachten, dass sich gram-negative und gram-positive Bakterien jedoch in den AI unterscheiden. Während gram-negative Bakterien überwiegend *N*-HSL als AI verwenden, kommunizieren gram-positive Bakterien meist über prozessierte Oligopeptide (Miller & Bassler, 2001).

Doch für beide gram-Arten gibt es Ausnahmen: *E. coli* als Beispiel für gram-negative Bakterien sekretiert kein *N*-HSL für das Quorum sensing, sondern ein AI-2 Molekül (s. Abb. 47) (Barrios et al., 2006). Dieses Molekül zeigt größere Unterschiede zu Butenolid auf als *N*-HSL. Dennoch zeigte *E. coli* ein verringertes Wachstum unter Butenolideinfluss auf. Die Vorstufe des AI-2 allerdings ist zum Butenolid ähnlicher (Abb. 47). Möglicherweise reicht die Vorstufe bereits aus um die Regulation des Wachstums zu steuern. Die nächste Frage, die es zu klären gilt ist, warum *B. subtilis* als gram-positives Bakterium ebenfalls gehemmt wird. Auger et al. (2006) haben am Beispiel von *Bacillus cereus* gezeigt, dass durch die Zugabe von AI-2 die Biofilmbildung in diesem gram-positiven Bakterium gehemmt wird. Scheinbar handelt es sich bei *B. cereus* ebenfalls um AI-2 als Quorum-sensing Molekül und nicht um ein Oligopeptid. Für *M. aureus* konnten keine Hinweise auf die Struktur des Quorum-sensing Moleküls gefunden werden. Aus diesem Grund wird angenommen, dass es

sich in diesem Falle um ein für gram-positive Bakterien typisches Oligopeptid handelt und deshalb keine Wachstumshemmung durch Butenolid eingetreten ist.

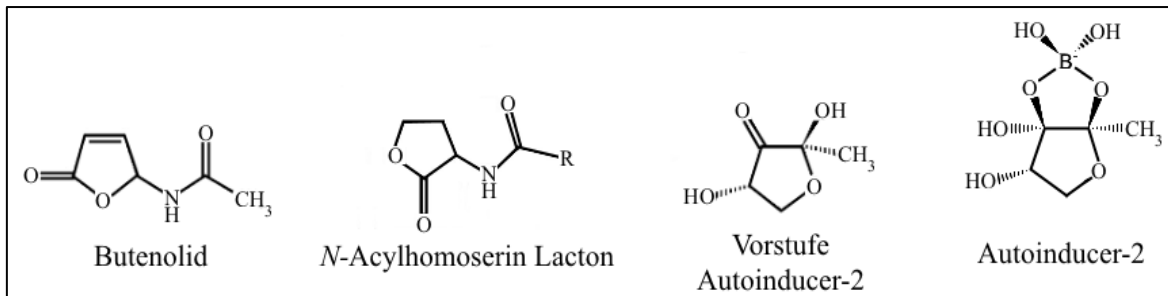


Abb. 47: Strukturformeln von Butenolid^A aus *F. graminearum*, N-Acylhomoserin Lacton^B und des Autoinducers-2^C und seiner Vorstufe^C. ^A Harris et al. (2006), ^B Von www.researchgate.com; ^C Aus Chen et al. (2002).

Ob Butenolid tatsächlich als Analogon zu Quorum-sensing Molekülen betrachtet werden kann bleibt zunächst unbeantwortet. Aufgrund der Strukturähnlichkeiten zu N-HSL und der Vorstufe des AI-2 ist diese Theorie jedoch durchaus vorstellbar.

Neben den Bakterien und Hefen wurden auch phytopathogene Pilze getestet. Hier zeigte sich ein zu den Bakterien gegensätzliches Ergebnis. Für alle getesteten Phytopathogene konnte ein verstärktes Wachstum nach 24 und 48 Stunden nachgewiesen werden, wenn Butenolid dem Medium hinzugesetzt wurde. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf das Vorhandensein membrangebundener Enzyme in der Zellwand von Konidien und Myzel zurückzuführen ist wurden Protoplasten von *F. graminearum* unter Zugabe von 80 µg/ml Butenolid regeneriert. Die Regenerationsrate war deutlich durch die Präsenz von Butenolid erhöht und zeigte sich in einer höheren Anzahl an gewachsenen Kolonien. Das bessere Wachstum der Pilze könnte damit zu erklären sein, dass Butenolid als zusätzliche Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle dient und metabolisiert wird. In Abbildung 48 sind Strukturformeln von verschiedenen Metaboliten aufgeführt, die von anderen filamentösen Pilzen als Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle genutzt werden können. Für *Neurospora crassa* und *A. nidulans* konnten Gencluster identifiziert werden, die für den Metabolismus von Quinat zuständig sind und durch die Anwesenheit dessen induziert werden (Giles et al., 1989; Lamp et al., 1990). Quinat dient, ebenso wie Shikimisäure, als alternative Kohlenstoffquelle und kann von vielen Pilzen metabolisiert werden (Griffin, 1994). Dies geschieht jedoch nur in Abwesenheit von Glucose, da beide Synthesewege durch Glukose unterdrückt werden. Die Strukturformeln dieser beiden Metabolite ähneln der von Butenolid. Dies trifft auch auf Prolin zu. Prolin kann jedoch entweder als Kohlenstoff-, oder als Stickstoffquelle von *A. nidulans* verwendet werden (Hull et al., 1989).

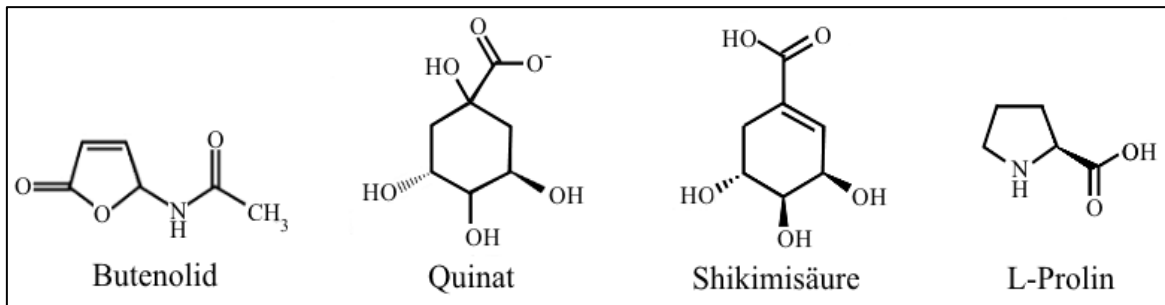


Abb. 48: Strukturformeln von Butenolid^A aus *F. graminearum*, Quinat^B, Shikimisäure^B und L-Prolin^B.

^A Harris et al. (2006), ^B National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database

Durch das erhöhte Wachstum der Phytopathogene in Butenolid-enthaltenem Medium schien Butenolid als zusätzliche Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle verwendet zu werden. Das verwendete Medium beinhaltete sowohl Glukose als Kohlenstoffquelle, als auch diverse Stickstoffquellen, sodass nicht bestimmt werden kann, welche Butenolid zusätzlich bediente. Das für die Regeneration der Protoplasten verwendete Medium allerdings beinhaltet hingegen mehrere Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. Ob Butenolid bei der Regeneration der Protoplasten ebenfalls als alternative Nährstoffquelle diene, sollte unter Verwendung eines Butenolid enthaltenden Minimalmediums getestet werden.

4.10 Gram-negative Bakterien werden nicht durch die Präsenz des Polyketids Aurofusarin im Wachstum beeinträchtigt

Neben der Synthese und Sekretion von Mykotoxinen, wie das bereits beschriebene DON oder Butenolid, werden noch eine Reihe weiterer Sekundärmetabolite während der Infektion durch *F. graminearum* produziert. Eines davon ist das Polyketid Aurofusarin (AUR). Mutanten, die in der Synthese dieses Polyketids unterbrochen sind, wachsen als weiße Kolonien, wohingegen das Wachstum des Wildtyps eine rote Färbung aufweist. AUR konnte deshalb als rotes Pigment von *F. graminearum* identifiziert werden (Malz et al., 2005). Während der Infektion im Freiland konnte von Klingenhagen & Frahm (1999) ein rotes Pigment beobachtet werden. Eine eingehende Charakterisierung der AUR-defizienten Mutanten durch die Deletion der Polyketidsynthase 12 (FgPKS12) wurde im Rahmen einer Dissertation von Dr. Sascha Malz durchgeführt (2004, AG Molekulare Phytopathologie, Universität Hamburg). Es konnte gezeigt werden, dass AUR erlässlich für die erfolgreiche Infektion von Weizen ist. Experimente zur bioaktiven Wirkung dieses Metabolits haben jedoch gezeigt, dass gram-positive Bakterien und Hefen in ihrem Wachstum inhibiert wurden. Gram-negative Bakterien wurden hingegen nicht beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere gram-negative Bakterien in Bezug auf ihre Resistenz gegenüber AUR untersucht. Nach der Herstellung eines Extraktes aus dem 8/1_DsRed Stamm und einer ΔFgPKS12 Mutante mittels Kalium-Phosphat-Puffer wurden die Bakterien entweder mit einem dieser Extrakte, bzw. mit dem Puffer als Kontrolle behandelt und das Wachstum nach 18 Stunden Inkubation über die Messung der OD₅₉₅ bestimmt. Für die Bakterien *P. fluorescens* sowie *Rhizobium spec.* und *Janthino*-Bakterium HH102 konnte unter allen Bedingungen ein ähnliches Wachstum festgestellt werden. Der AUR-enthaltene Extrakt des 8/1_DsRed Stammes führte zu keiner Wachstumsverringernug. Dass der verwendete Extrakt eine inhibierende Wirkung aufwies wurde unter Verwendung

von *Candida albicans* nachgewiesen (nicht gezeigt). Frühere Versuche haben ebenfalls gezeigt, dass ein AUR-enthaltener Extrakt das Wachstum dieses Pilzes hemmt.

Dass sich AUR nicht auf das Wachstum gram-negativer Bakterien auswirkt, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Welcher Mechanismus allerdings hinter der Inhibierung gram-positiver Bakterien und Hefen steht ist bislang noch nicht bekannt. Der Aufbau und die Zusammensetzung der Zellwand dieser Organismen könnten einen Hinweis dafür liefern. So besitzen sowohl gram-positive Bakterien, als auch Hefezellen nur eine Membran, die es zu überwinden gilt. Gram-negative Bakterien besitzen hingegen neben der Zytoplasmamembran noch eine äußere Membran. Auch die Zusammensetzung der Zellwände unterscheidet sich. Gram-positive Bakterien besitzen über der Zytoplasmamembran mehrere Mureinschichten. Murein ist ein Peptidoglykan, das sich aus *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin, also aus Monosacchariden, zusammensetzt. Die Zellwand von Hefen besteht aus Glucanen und Chitin. Dieser aufgelagert liegt eine äußere Schicht aus Mannoproteinen (Osumi, 1998). Mannoproteine sind Verbindungen aus Proteinen und Polysacchariden. Gram-negative Bakterien besitzen nur eine dünne Mureinschicht über der Zytoplasmamembran, der eine weitere Membran folgt. Die Außenseite dieser ist mit Lipopolysacchariden (LPS) besetzt (Lugtenberg & van Alphen, 1983). Diese setzen sich aus drei Bestandteilen zusammen: Das O-Antigen besteht aus mehreren Oligosaccharideinheiten und ist für bestimmte Arten spezifisch. Der zweite Bestandteil von LPS ist das Core-Polysaccharid. Die Außenseite besteht aus *N*-Acetylglucosamin und Galaktose, die innere Schicht aus Keto-desoxy-octonat (KDO). KDO stellt die Verbindung mit der dritten Einheit der LPS, des Lipid A, her. Bei Lipid A handelt es sich um ein Disaccharid mit veresterten Fettsäuren an den OH-Gruppen. Lipid A ist an der äußeren Membran gram-negativer Bakterien verankert (Osborn, 1969).

Es wurde gezeigt, dass diese LPS Schicht als Schutz gegen Actinomycin D (Hurwitz et al., 1962) und Lysozym (Repaske, 1958) dient. Leive (1968) konnte die Sensitivität gegenüber diesen und anderen Substanzen erhöhen, nachdem die LPS Schicht durch die Behandlung mit EDTA teilweise entfernt wurde. Möglicherweise ist die Resistenz gram-negativer Bakterien gegenüber AUR auf eben jene LPS Schicht zurückzuführen. Hierfür müsste eine EDTA-Behandlung dieser Bakterien mit anschließender AUR-Behandlung durchgeführt werden um diese Hypothese zu überprüfen. Sollten die LPS der gram-negativen Bakterien für die AUR-Resistenz verantwortlich sein würde dies bedeuten, dass die hemmende Wirkung des Butenolids auf anderem Wege erfolgt, da Butenolid sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien hemmt.

4.11 Die Cerato-platanine FgCPP1 und FgCPP2 sind nicht an der Infektion von Weizen beteiligt

Der letzte Teil dieser Dissertation beschäftigte sich mit der Charakterisierung zweier Cerato-platanin (CPP) Homologe aus *F. graminearum*. Beim ursprünglich entdeckten Cerato-platanin handelt es sich um ein Cystein-reiches Protein aus *C. platani*. Neben seinen phytotoxischen Eigenschaften ist es ein kleines, hydrophobes Protein mit einer Länge von 120 – 140 Aminosäuren (AS) (Pazzagli et al., 1999; 2014). Generell besitzen CPP Homologe eine eben solche Domäne und vier konservierte Cystein-Reste, die nachweislich Disulfid-Brücken ausbilden.

Im Genom von *F. graminearum* konnten fünf Gene identifiziert werden, die eine solche Cerato-platanin Domäne besitzen. Sequenz- und Motivvergleiche mit bereits bekannten und charakterisierten CPP haben ergeben, dass nur zwei dieser fünf Gene, FgCPP1 und FgCPP2, für Proteine kodieren, die die typischen Eigenschaften der CPP besitzen. Sie enthalten als einzige ausschließlich die vier konservierten Cystein-Reste, während für die anderen drei möglichen CPP (FGSG_04471, FGSG_17103, FGSG_03971) ebenfalls zusätzliche Cysteine nachgewiesen werden konnten. Auch die typische Länge dieser Proteine von 120-140 Aminosäuren war nur für FgCPP1 und FgCPP2 gegeben. Andere *F. graminearum* CPP waren entweder länger (219, 217 AS), oder wesentlich kürzer (64 AS).

Zu den bereits charakterisierten CPP gehören BcSpl1 aus *B. cinerea* und MSP1 aus *M. grisea*. Für beide Proteine konnte eine wichtige Rolle während der Infektion nachgewiesen werden, welche sich in einer reduzierten Virulenz äußerte (Jeong et al, 2007; Frías et al, 2011). Dieser Umstand machten FgCPP1 und FgCPP2 zu interessanten Kandidaten für eine eingehende Charakterisierung.

Nach der gezielten Ausschaltung beider Gene wurde zunächst die frühe Infektionsphase näher betrachtet. Wie bereits erwähnt bildet *F. graminearum* während der initialen Infektionsphase Infektionsstrukturen aus. Um zu überprüfen, ob die Ausbildung dieser Strukturen in den Δ FgCPP1 und Δ FgCPP_{1,2} Mutanten gestört ist, wurden Weizenvorspelzen mit Konidien dieser Stämme inokuliert und nach 6 Tagen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Mutanten und dem 8/1_DsRed Stamm beobachtet werden. Die Deletion von FgCPP1 und FgCPP2 hat keinen Einfluss auf die Bildung von Infektionsstrukturen. Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit, dass die Infektion aufgrund der Deletion gestört ist, da selbst eine DON-defiziente Mutante in der Lage ist, Infektionsstrukturen auszubilden und das Pflanzengewebe zu penetrieren (Boenisch & Schäfer, 2011). Erst die weitere Ausbreitung ist anschließend gestört. Deshalb wurde die Pathogenität dieser Mutanten überprüft. Es zeigte sich, dass sowohl die Δ FgCPP1, als auch die Δ FgCPP_{1,2} Mutanten in der Lage waren, das typische Ausbleichen der Ähre 21 Tage nach der Inokulation hervorzurufen. Es konnte kein Unterschied zum Referenzstamm beobachtet werden.

Zuletzt wurde überprüft, ob die beiden FgCPP an der oxidativen oder osmotischen Stressantwort von *F. graminearum* beteiligt sind. Das Wachstum auf Festmedien, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an H₂O₂ bzw. mit 1 M NaCl versetzt wurden, wurde nach 3-tägiger Inkubation der Platten ausgewertet. Auch hier konnte kein Unterschied zum Referenzstamm nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass FgCPP1 und FgCPP2 nicht für die erfolgreiche Weizeninfektion durch *F. graminearum* wichtig sind. Für das Pathogen *Leptosphaeria maculans* konnte ebenfalls kein Einfluss von CPP während der Infektion nachgewiesen werden (Wilson et al., 2002). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere Faktoren sekretiert werden, die die Funktion der CPP einnehmen. Wie zu Beginn dieser Dissertation diskutiert, könnte ein solcher Faktor das Mykotoxin DON sein. Die sekretierte Lipase 1 (FgFGL1; Voigt et al., 2005) wurde ebenfalls als Virulenzfaktor für die Weizeninfektion beschrieben. Ob die DON-Synthese oder die Expression von Fgl1 in den Mutanten verändert ist, wurde nicht überprüft. Weitere Analysen zur Bedeutung der FgCPP1 und FgCPP2 wurden von Quarantin et al. (2016) durchgeführt. De Oliveira et al. (2011) haben gezeigt, dass CPP an N-Acetylglucosamin und Chitin binden können. Weitere Studien haben die mögliche Lokalisation in der pilzlichen Zellwand nachgewiesen (Gaderer et al., 2014; Pazzagli et al.,

2014). Quarantin et al. (2016) haben aufgrund dieser Annahme sowohl Konidien als auch Myzel der FgCPP Einzel- und Doppel-Mutanten sowohl mit Chitinase, als auch mit einer β -1,3-Glucanase behandelt. Die Chitinasebehandlung führte tatsächlich bei den Mutanten zu einem, im Vergleich zum Wildtyp, reduzierten Wachstum. Außerdem führte die Behandlung mit einer Glucanase nur bei den Mutanten zur Freisetzung von reduzierten Zuckern. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass FgCPP1 und FgCPP2 aus *F. graminearum* für die Stabilität bzw. den Schutz der Zellwand zuständig sind, da sowohl Chitinasen als auch β -1,3-Glucanasen von Pflanzen zur Pathogenabwehr sekretiert werden (Van Loon et al., 2006). Diese Enzyme werden jedoch auch von Pilzen und Bakterien sekretiert. So könnten FgCPP1 und FgCPP2 ebenfalls dem Schutz gegen angreifende Konkurrenten dienen.

Da die Deletionsmutanten jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ebenso pathogen sind wie der Referenzstamm, scheint die enzymatische Aktivität der sekretierten Chitinasen und β -1,3-Glucanasen der Pflanze trotzdem keinen Einfluss auf das Infektionsverhalten zu haben.

5. Zusammenfassung

F. graminearum ist ein filamentöser Ascomycet, der kleinkörniges Getreide, wie Weizen, über die Blüte befällt. Die Folgen einer Infektion sind zum einen quantitative Einbußen, da der Befall zu unvollständig ausgebildeten Körnern führt. Durch die Sekretion von schädlichen Mykotoxinen während des Infektionsverlaufs kommt es außerdem zur Kontamination des Getreides, wodurch es weder für Menschen, noch für Tiere als Nahrungsmittel verwertbar ist. In der frühen Phase der Infektion bildet *F. graminearum* zunächst epiphytisch wachsende Laufhyphen (LH) aus, die der Kolonisierung der Pflanzenoberfläche dienen. Durch Differenzierungsprozesse bilden sich Infektionskissen (IK) aus, mit denen der Pilz in das pflanzliche Gewebe eindringen und es letztendlich kolonisieren kann. Es ist nicht bekannt, welche genetischen Unterschiede zwischen diesen Strukturen vorliegen. Die Erstellung und der Vergleich von cDNA Banken von LH und IK sollen hierbei Aufschluss bringen. Zusätzlich dazu wurden cDNA Banken einer axenischen Kultur erstellt und ebenfalls für einen Vergleich herangezogen. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Validierung dieser Daten unter Verwendung der qRT-PCR Methode. Es konnte gezeigt werden, dass die durch die Sequenzierung erhaltenen Expressionsprofile mittels qRT-PCR reproduziert und somit validiert werden konnten.

Über die Rolle, die Sekundärmetabolite in der frühen Infektionsphase spielen, ist bislang wenig bekannt. In der vorliegenden Dissertation sollte aus diesem Grund die initiale Infektionsphase näher untersucht werden. Für das Mykotoxin DON ist bisher bekannt, dass es unerlässlich für die Überwindung des Rachisknotens und die Kolonisierung von Weizenähren ist. Die molekulare Quantifizierung von Pilzmaterial in infizierten Weizenähren konnte zeigen, dass eine DON-defiziente Mutante bereits drei und fünf Tage nach der Inokulation eine deutliche Verringerung der Virulenz aufzeigte. Histologische Studien unterstützten diese Beobachtung. Somit konnte für DON eine tragende Rolle in der frühen Infektionsphase nachgewiesen werden.

Als weiteres Sekundärmetabolit wurde die Funktion von Butenolid näher untersucht. Als erstes wurde sowohl der Zeitpunkt der Expressionsinitiierung, als auch der der Sekretion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der cluster-interne Transkriptionsfaktor bereits 24 Stunden nach der Inokulation stark exprimiert wird. Nach 48 Stunden konnten sowohl weitere Gene via PCR, als auch Butenolid via LC-MS/MS Analyse *in planta* nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung der Funktion von Butenolid fand mit Mutanten statt, die durch die Deletion der cluster-eigenen Cytochrom P450 Monooxygenase kein Butenolid synthetisieren konnten. Infektionsstudien mit diesen Mutanten haben gezeigt, dass das Schadbild nach 21 Tagen dem des verwendeten Referenzstammes entspricht. Bei Betrachtung der frühen Infektionsphase nach fünf Tagen konnte allerdings eine erhöhte Virulenz sowohl durch eine molekulare Quantifizierung, als auch durch histologische Analysen nachgewiesen werden. Dieser Phänotyp konnte genetisch und chemisch komplementiert werden. Die genetische Komplementation durch die ektopische Reintegration der Gensequenz führte jedoch zu einer im Vergleich zum Referenzstamm verringerten Virulenz. Die konstitutive Überexpression der cluster-spezifischen Cytochrom P450 Monooxygenase führte zu einer drastischen Reduktion an sekretiertem Butenolid *in planta* und zu einer verringerten Virulenz. Eine Expressionsanalyse aller Clustergene hat ergeben, dass eine Deregulation des Butenolidclusters vorlag.

Um ein mögliches Angriffsziel des Butenolids zu identifizieren, wurde die mitochondriale Atmung von Weizenvorspelzen nach einer Inkubation in Butenolid analysiert. Es konnte eine Erhöhung der nicht-mitochondrialen und eine Verringerung der ATP-gekoppelten Atmung in behandelten Spelzen beobachtet werden. Der Einfluss von Butenolid auf den Sauerstoffverbrauch während der Infektion von Vorspelzen konnte nicht beobachtet werden. Die Vorbehandlung von Weizenähren mit synthetischem Butenolid sollte Aufschluss darüber geben, ob sich dies auf die Infektion mit dem Referenzstamm auswirkt. Die Vorbehandlung der Weizenblüten führte zu einer reduzierten Infektion. *In vitro* Versuche haben jedoch gezeigt, dass Butenolid keine hemmende Wirkung auf phytopathogene Pilze hat, sondern zu einem stärkeren Wachstum führt. Das Wachstum von Bakterien konnte in Butenolid-versetztem Medium gehemmt werden.

Für das Polyketid Aurofusarin wurde in Vorversuchen bereits gezeigt, dass es eine bioaktive Wirkung gegen gram-positive, jedoch nicht gegen gram-negative Bakterien besitzt. Unter Verwendung weiterer gram-negativer Bakterienarten konnten die Ergebnisse der Vorversuche in dieser Arbeit bestätigt werden. Die hier getesteten gram-negativen Bakterien wurden nicht im Wachstum von Aurofusarin beeinflusst.

Zuletzt wurden in der vorliegenden Dissertation Homologe Cerato-platanin Proteine (CPP) in *F. graminearum* identifiziert und charakterisiert. Aus fünf putativen CPPs konnten durch *in silico* Analysen und Sequenzvergleiche zwei Proteine identifiziert werden, die eine hohe Homologie zu bereits bekannten CPPs besaßen. Die Charakterisierung von Einzel- und Doppeldeletionsmutanten der Gene FgCPP1 und FgCPP2 wurde anhand mikroskopischer Analysen, Infektionsstudien und Wachstumsassays durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass FgCPP1 und FgCPP2 weder an der Ausbildung von Infektionsstrukturen, noch an einer erfolgreichen Infektion von Weizen beteiligt sind. Die oxidative und osmotische Stressantwort der Mutanten ist ebenfalls unverändert.

6. Abstract

F. graminearum is a filamentous ascomycete that infects small grains like wheat through florets. Infected grains show undeveloped kernels and are highly contaminated with mycotoxins which are harmful for animals and humans. During the early stage of infection, *F. graminearum* forms epiphytically growing hyphae, called runner hyphae (RH), to spread over the plant surface. Later, infection cushions (IC) are developed for penetrating and colonising the plant tissue. Until now, there is neither information available regarding the molecular basis of IC development, nor genetic differences between RH and IC. Using Illumina sequencing, cDNA libraries of both, RH and IC, were compared in terms of expression profiles to find genes which are either highly regulated in IC or RH. In addition, the comparison with an axenic culture should give insight into differences between *in planta* and *in vitro* growth. The aim of the first part of this thesis is to reproduce and validate the generated expression profiles using qRT-PCR.

There is little information available regarding the function of secondary metabolites during the early infection stage. The objective of the second part of this work was to analyse this specific stage. The mycotoxin DON is known to play an essential role in colonising the whole wheat spike, because a DON deficient mutant is not able to cross the rachis node of an infected spikelet. Using molecular quantification of fungal material in infected plant tissue and histological studies, I could demonstrate that already in the early infection phase, three and five days post inoculation, the DON deficient mutant shows a significant reduction in virulence. These results show that besides crossing the rachis node, DON is also essential for the initial infection of plant tissue.

Another secondary metabolite analysed was butenolide. The first step was to find out, at which time point after infection the expression of cluster genes was initiated. Secondly, infected plant material was analysed using LC-MS/MS. The aim was to determine whether or not butenolide gets secreted. 24 hours after infection, the transcript of the cluster specific transcription factor was detected. No other transcript was detectable at this time point. After 48 hours, additional genes were expressed and Butenolide was secreted.

For functional characterization of butenolide during infection, mutants unable to synthesise butenolide were generated. For this, the cluster internal cytochrome P450 monooxygenase was deleted. Molecular quantification and histological studies revealed an increased virulence of the butenolide deficient mutants in the early infection stage. This phenotype was complemented using a genetic as well as a chemical approach. For the genetic complementation, the genomic sequence of the deleted gene was integrated ectopically into the genome and resulted in an even decreased virulence towards wheat compared to the reference strain. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase resulted in a drastic reduction in butenolide synthesis after five days of infection. Furthermore, virulence was decreased and expression analysis of all cluster genes showed a de-regulation for almost all genes.

To detect a putative target of butenolide, mitochondrial respiration of wheat paleae incubated in butenolide was investigated. The Butenolide treatment resulted in a higher non-mitochondrial respiration rate and a reduction in ATP-linked respiration. An influence of butenolide on mitochondria during infection of wheat paleae could not be observed.

It is not known whether a pre-treatment of wheat florets with butenolide influences the infection process. After 24 hours, pre-treated wheat florets were inoculated with conidia of

the reference strain. The butenolide treatment resulted in a reduced virulence compared to a control approach. However, this reduced infection is not attributed to an inhibitory effect of butenolide. Growth assays *in vitro* using butenolide supplemented media showed that only bacteria are affected in growth. In contrast, several phytopathogenic fungi including *F. graminearum* displayed a higher growth rate after 24 and 48 hours.

A third aspect of this thesis deals with the polyketide pigment aurofusarin acts as a bioactive compound against gram-positive bacteria. Growth of gram-negative bacteria is not affected. Additional gram-negative bacteria were tested for their susceptibility for aurofusarin. All tested gram-negative bacteria were not affected.

The last topic of this thesis was the identification and characterisation of cerato-platanine protein (CPP) homologues in *F. graminearum*. Using *in silico* tools, two CPPs out of five putative CPPs in *F. graminearum* were identified. Characterisation of FgCPP1 and FgCPP2 was investigated using deletion mutants for microscopical analysis of infection structures, infection studies on wheat and growth assays. The results of this work show that FgCPP1 and FgCPP2 do not contribute to infection structure development as well as successful infection of wheat. Furthermore, no function in oxidative and osmotic stress tolerance was observed.

7. Literaturverzeichnis

Links:

Strukturformeln:

N-Acylhomoserin Lactone, zugegriffen am 15.08.2017

https://www.researchgate.net/profile/Jian_Woon_Chen2/publication/264641731/figure/fig1/AS:203218148696066@1425462390379/General-structure-of-N-acyl-homoserine-lactone-AHL-where-R-represents-the-various-acyl.png

Quinat, zugegriffen am 15.08.2017

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1560034, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1560034>

Shikimisäure, zugegriffen am 15.08.2017

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=8742, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8742>

Prolin, zugegriffen am 15.08.2017

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=145742, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145742>

Publikationen:

Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H., Kohmoto, K. (1997) AAL-toxin deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme mediated integration. *Phytopathol* 87: 967–972.

Alvarez-Venegas, R. (2014) Bacterial SET domain proteins and their role in eukaryotic chromatin modification. *Front. Genet.* 5.
Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3980110/>. Accessed 29 April 2014.

Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., Fluhr, R. (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* 143: 1817–1826.

Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., Gohar, M. (2006) Autoinducer 2 Affects Biofilm Formation by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1): 937-941.

Bacelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., Pazzagli, L. (2014) Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 175-184.

- Bai, G. H., Desjardins, A. E., Plattner, R. D. (2002)** Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, 153: 91-98.
- Bai, T.-T., Xie, W.-B., Zhou, P.-P., Wu, Z.-L., Xiao, W.-C., et al. (2013)** Transcriptome and Expression Profile Analysis of Highly Resistant and Susceptible Banana Roots Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. *PLoS ONE* 8(9): e73945.
- Bai, G., Shaner, G. (1994)** Scab of Wheat: Prospects for Control. *Plant Dis.* 78(8): 760-766.
- Baillie, G. S. (1993)** The Characterization of Cytochromes P450 from *Aspergillus fumigatus*. Thesis No. DX 176224, University of Kent, Canterbury, UK.
- Barrios, A. F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bentley, W. E., Wood, T. K. (2006)** Autoinducer 2 Controls Biofilm Formation in *Escherichia coli* through a Novel Motility Quorum-Sensing Regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology* 188(1): 305-316.
- Berruyer, R., Adreit, H., Milazzo, J., Gaillard, S., Berger, A., Dioh, W., Lebrun, M. H., Tharreau, D. (2003)** Identification and fine mapping of *Pi33*, the resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1139-1147.
- Bhatnagar, R. K., Ahmed, S., Kohli, K. K., Mukerji, K. G., Venkatasubramanian, T. A. (1982)** Induction of polysubstrate monooxygenase and aflatoxin production by phenobarbitone in *Aspergillus parasiticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 1287–1292.
- Bhavanishankar, T. N., Ramesh, H. P., and Shantha, T. (1988)** Dermal toxicity of *Fusarium* toxins in combinations. *Arch. Toxicol.* 61: 241–244.
- Bluhm, B. H., Woloshuk, C. P. (2005)** Amylopectin induces fumonisin B-1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 18: 1333-1339.
- Blümke, A., Falter, C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schäfer, W., Feussner, I., Voigt, C.A. (2014)** “Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection”. *Plant Physiology* 165: 346-358.
- Blümke, A., Sode, B., Ellinger, D., Voigt, C. A. (2015)** Reduced susceptibility to *Fusarium* head blight in *Brachypodium distachyon* through priming with the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Molecular Plant Pathology*, 16(5): 472–483.
- Boenisch, M. J., Schäfer, W. (2011)** *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology* 11: 110.

- Böhnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.- L., Lebrun, M.- H. (2004)** A Putative Polyketide Synthase/Peptide Synthetase from *Magnaporthe grisea* Signals pathogen Attack to Resistant Rice. The Plant Cell, Vol. 16: 2499-2513.
- Bok, J. W., Keller, N. P. (2004)** Global regulation of secondary metabolic gene clusters. Eukaryot Cell 3: 527-535.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P., Keller, N. P. (2006)** Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology, 61(6): 1636-1645.
- Bormann, J., Boenisch, M. J., Brückner, E., Firat, D., Schäfer, W. (2014)** The Adenylyl Cyclase Plays a Regulatory Role in the Morphogenetic Switch from Vegetative Pathogenic Lifestyle of *Fusarium graminearum* on Wheat. PLoS ONE 9(3): e91135.
- Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H., Leonard, T. J. (1996)** Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1418-1422.
- Brown, N. A., Urban, M., Van de Meene, A. M. L., Hammond-Kosack, K. E. (2010)** The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. Fungal biology, 114: 555-571.
- Butler, M.J., Day, A.W., Henson, J.M., Money, N.P. (2001)** Pathogenic properties of fungal melanins. Mycologia 93: 1–8.
- Chang, P. K., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Bennett, J. W., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., Payne, G. A. (1993)** Cloning of the *Aspergillus parasiticus* apa-2 gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3273-3279.
- Chang, P.K., Yu, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (1999)** Repressor–AFLR interaction modulates aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia 147: 105–112.
- Chen, H., Kovalchuk, A., Keriö, S., Asiegbu, F.O. (2013)** Distribution and bioinformatics analysis of the cerato-platanin protein family in Dikarya. Mycologia 105: 1479-1488.
- Chen, Y. P., Yuan, G. F., Hsieh, S. Y., Lin, Y. S., Wang, W. Y., Liaw, L. L., Tseng, C. P. (2010)** Identification of the mokH gene encoding transcription factor for the upregulation of Monacolin K biosynthesis in *Monascus pilosus*. J Agr Food Chem., 58: 287–293.
- Choquer, M., Dekkers, K. L., Chen, H. Q., et al. (2005)** the CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 18(5): 468-476.

- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., Hieter, P. (1992)** Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110: 119-122.
- Coleman, J. J. & Mylonakis, E. (2009)** Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLoS Pathog.* 5(6): e1000486.
- Collemare, J., Pianfetti, M., Houlle, A.- E., Morin, D., Camborde, L., et al. (2008)** *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytol* 179: 196–208.
- Collemare, J. and Lebrun, M.-H. (2011)** Fungal Secondary Metabolites: Ancient Toxins and Novel Effectors in Plant–Microbe Interactions, in *Effectors in Plant-Microbe Interactions* (eds F. Martin and S. Kamoun), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Colombatti, F., Gonzalez, D., H., Welchen, E. (2014)** Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.006>
- Cornforth, J.W., Ryback, G., Robinson, P.M., Park, D. (1971)** Isolation and Characterization of a Fungal Vacuolation Factor (Bikaverin). *J. Cehem. Soc. (C)*: 2786-2788.
- Covarelli, L., Turner, A. S., Nicholson, P. (2004)** Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of Tri genes in *Fusarium culmorum* by fungicides in vitro. *Plant Pathology*, 53: 22-28.
- Dayan, F. E., Ferreira, D., Wang, Y. H., et al. (2008)** A pathogenic fungi diphenyl ether phytotoxin targets plant enoyl (acyl carrier protein) reductase. *Plant Physiology* 147(3): 1062-1071.
- Deacon, J.W. (1997)** *Modern Mycology*, 3rd Edition, Chapter 8 Genetics, Blackwell Science, S. 144.
- de Oliveira, A.L., Gallo, M., Pazzagli, L., Benedetti, C.E., Cappugi, G., Scala, A., Pantera, B., Spisni, A., Pertinhez, T.A., Cicero, D.O. (2011)** The structure of the elicitor Cerato-platanin (CP), the first member of the CP fungal protein family, reveals a double $\psi\beta$ -barrel fold and carbohydrate binding. *J. Biol. Chem.* 286: 17560-17568.
- Desmond, O. J., Manners, J. M., Stephens, A. E., Maclean, D. J., Schenk, P. M., Gardiner, D. M., et al. (2008)** The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular plant pathology*, 9: 435-445.

- Diamond, M., Reape, T. J., Rocha, O., Doyle, S. M., Kacprzyk, J., et al. (2013)** The *Fusarium* Mycotoxin Deoxynivalenol Can Inhibit Plant Apoptosis-Like Programmed Cell Death. *PLoS ONE* 8(7): e69542.
- Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L., Orbach, M., Lebrun, M. H. (2000)** Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 217-227.
- Dowzer, C.E., and Kelly, J.M. (1991)** Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 11: 5701–5709.
- Dutta, D., Ghosh, D. K., Mishra, A. K., Samanta, T. B. (1983)** Induction of a Benzo(a)Pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Evidence for multiple forms of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115(2): 692–699.
- Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Cary, J. W. (1999)** Binding of the C6-zinc cluster protein, AflR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene* 230: 249–57.
- Elthon, T. E., McIntosh, L. (1987)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8399–8403.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300: 1005-1016.
- Espeso, E.A., Peñalva, M.A. (1992)** Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 6: 1457–1465.
- Espino, J. J., Gutierrez-Sanchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., Gonzalez, C. (2010)** The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10: 3020-3034.
- Feng, G. C., Sun, C. Y., Zhang, N. Q. (1987)** Report on the result of the detection of butenolide in the maize in the regions of Keshin-Bech Disease. *Chinese Journal of Endemiology* 6: 266.
- Fernandes, M., Keller, N.P., Adams, T.H. (1998)** Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol Microbiol* 28: 1355–1365.
- Feron, V. J., Kruysse, A., Immel, H. R., Til, H. P. (1979)** Repeated exposure to butenolide vapour: subacute study in Syrian golden hamsters. *Toxicology* 15: 65–68.
- Flaherty, J. E., Payne, G. A. (1997)** Overexpression of aflR leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3995–4000.

- Foroud, N. A., Ouellet, T., Laroche, A., Oosterveend, B., Jordani, M. C., Ellis, B. E., Eudes, F. (2012)** Differential transcriptome analyses of three wheat genotypes reveal different host response pathways associated with *Fusarium* head blight and trichothecene resistance. *Plant Pathology* 61: 296–314.
- Fox, E. M., Howlett, B. J. (2008)** Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* 11: 481–487.
- Frías, M., Gonzalez, C., Brito, N. (2011)** BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* 192: 483–495.
- Gaderer, R., Bonazza, K., Seidl-Seiboth, V. (2014)** Cerato-platanins: a fungal protein family with intriguing properties and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 4795–4803.
- Gardiner, D. M., Kazan, K., Manners, J. M. (2009)** Novel Genes of *Fusarium graminearum* That Negatively Regulate Deoxynivalenol Production and Virulence. *MPMI* Vol. 22, 12: 1588–1600.
- Ghosh, D. K., Dutta, D., Samanta, T. B., Mishra, A. K. (1983)** Microsomal Benzo(a)Pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Assay and characterization of the enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113(2): 497–505.
- Giles, N. H., Geever, R. F., Asch, D. K., Avalos, J., Case, M. E. (1989)** Organization and regulation of the qa (quinit acid) genes in *Neurospora crassa* and other fungi. *Heredity* 82: 1–7.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L. F., Foley, R. C., Anderson, C. R., Carroll, A. J., Millar, A. H., Singh, K. B. (2011)** Mitochondrial complex II has a key role in mitochondria-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 10768–10773.
- Gilbert, J., Fernando, W. G. D. (2004)** Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26: 464–472.
- Goswami, R. S., Kistler, H. C. (2004)** Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5(6): 515–525.
- Goudet, C., Milat, M. L., Sentenac, H., et al. (2000)** Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(2): 203–209.
- Griffin, D. H. (1994)** *Fungal Physiology*. 215–300. Wiley-Liss. New York.

- Güldener, U., Seong, K.- Y., Boddu, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J.- R., Adam, G., Mewes, H.- W., Muehlbauer, G. J., Kistler, H. C. (2006)** Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet. Biol.* 43: 316-325.
- Harris, L. J., Alexander, N. J., Saparno, A., Blackwell, B., McCormick, S. P., et al. (2007)** A novel gene cluster in *Fusarium graminearum* contains a gene that contributes to butenolide synthesis. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 44: 293–306.
- He, J., Duan, Y., Hua, D., Fan, G., Wang, L., liu, Y., Chen, Z., han, l., Qu, L.- J., Gong, Z. (2012)** DEXH Box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in *Arabidopsis* mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *Plant Cell* 24: 1815-1833.
- Hegg, E. L., Que, L. Jr. (1997)** The 2-His-1-carboxylate facial triad- an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur. J. Biochem.* 250: 625-629.
- Ho, L. H. M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Thirkettle_Watts, D., Van Akem, O., Whelan, J. (2008)** Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial preteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147: 1858-1873.
- Hohn, T. M., Beremand, P. D. (1989)** Isolation and nucleotide sequence of a sesquiterpene cyclase gene from the trichothecene-producing fungus *Fusarium sporotrichioides*. *Gene* 79:131-138.
- Hranueli, D., Peric, N., Borovicka B, Bogdan, S., Cullum, J., Waterman, P.G., Hunter, I.S. (2001)** Molecular biology of polyketide biosynthesis. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 203–213.
- Hull, E. P., Green, P. M., Arst, H. N. Jr., Scazzocchio, C. (1989)** Cloning and physical characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 3: 553-559.
- Hurwitz, J., Furth, J. J., Malamy, M., Alexander, M. (1962)** The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 48: 1222-1230.
- Ilgen, P., Hadel, B., Maier, F. J., Schäfer, W. (2009)** Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 22: 899-908.

- Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.H., Felk, A., Maier, F.J. (2005)** Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102: 16892–16897.
- Jeong, J.S., Mitchell, T.K., Dean, R.A. (2007)** The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. FEMS Microbiol. Lett. 273: 157-165.
- Johnston, M. (1987)** A model fungal gene regulatory mechanism: The GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 51: 458-476.
- Johnston, M., Carlson, M. (1992)** Regulation of carbon and phosphate utilization. In “The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression (Jones, E., Pringle, J., Broach, J., eds) Vol. 2: 193-281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Juszczuk, I. M., Szal, B., Rychter, A. M. (2012)** Oxidation-Reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction) Plant Cell Environ. 35: 296-307.
- Kamoun, S. (2009)** The secretome of plant-associated fungi and oomycetes. In: H. Deising (ed) Plant relationships, The Mycota V, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Karpova, O. V., Kuzmin, E. V., Elthon, T. E., Newton, K. J. (2002)** Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. Plant Cell 14: 3271-3284.
- Keller, N. P., Hohn, T. M. (1997)** Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. Fungal Genetics and Biology, 21: 17-29.
- Keller, N. P., Shwab, E. K. (2008)** Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. Mycological Research 112: 225-230.
- Kjær, D., Kjær, A., Pedersen, C., Bu'Lock, J.D., Smith, J.R. (1971)** Bikaverin and Norbikaverin, Benzoxanthentrione Pigments of *Gibberella fujikuroi*. J. Chem. Soc. (C): 2792-2797.
- Klingenhagen, G., Frahm, J. (1999)** Fusariumbefall im Getreide. GetreideMagazin 5(2).
- Koga, H., Dohi, K., Nakayachi, O., Mori, M. (2004)** A novel inoculation method of *Magnaporthe grisea* for cytological observation of the infection process using intact leaf sheaths of rice plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 64: 67–72.
- Kotik, A.N., Trufanova, V.A. (1998)** Detection of naphthoquinone fusariotoxin aurofusarin in wheat. Mikol. Fitopatol. 32: 58–61.

- Kreitmann, G., Nord, F.F. (1949)** Lycopersin, pigment of *Fusarium lycopersici*. Arch. Biochem. 21: 457-458.
- Lamb, H. K., Hawkins, A. R., Smith, M., Harvey, I. J., Brown, J., Turner, G., Roberts, C. F. (1990)** Spatial and biological characterisation of the complete quinic acid utilisation gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. 223: 17-23.
- Leive, L. (1968)** Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by ethylenediaminetetra-acetate. J. Biol. Chem., 243: 2373-2380.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2014)** SMART: recent updates, new developments and status in 2015. Nucleic Acids Research, 43: 257–260.
- Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H., Greenberg, J. T. (2003)** Ceramides modulate programmed cell death in plants. Genes & development, 17: 2636-2641.
- Linnemannstöns, P., Schulte, J., del Mar Prado, M., Proctor, R.H., Avalos, J., Tudzynski, B. (2002)** The polyketide synthase gene pks4 from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. Fungal Genetics and Biology 37: 134-148
- Li, F. S., Guan, J. Y., Zou, L. M., Duan, Y. J., Ma, P., Quan, X. D., Sun, Q., Li, L., Li, X. Y., Zhang, S. L. (1992)** Keshan disease- an antioxidant ability deficient disease characterized by mitochondrial damage in myocardium. Chin. J. Contr. Endemic Dis. 7: 133–137.
- Liu, O. H., Peng, S. Q., Yang, H. Y., Wang, G. Q. (2005)** Effect of butenolide on the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of myocardium mitochondria. Journal of Toxicology 19: 18-20.
- Lugtenberg, B., Van Alphen, L. (1983)** Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta, 737: 51-115.
- Lysøe, E., Seong, K.Y., Kistler, H.C. (2011)** The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. Mol. Plant-Microbe Interact. 24: 995-1000.
- Maggio-Hall, L. A., Wilson, R. A., Keller, N. P. (2005)** Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production *in planta*. Mol. Plant. Microbe. Interact. 18: 783-793.
- Maier, F. J., Miedaner, T., Haderler, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., et al. (2006)** Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. Molecular plant pathology, 7: 449-461.

- Malz, S., Grell, M. N., Thrane, C., Maier, F. J., Rosager, P., Felk, A., Albertsen, K. S., Salomon, S., Bohn, L., Schäfer, W., Giese, H. (2005)** Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genet Biol.* 42(5): 420-33.
- Malolepsza, U. (2006)** Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Crop Protection*, 25 (9): 956-962.
- Marzluf, G.A. (1997)** Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 17–32.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., et al. (2014)** JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 42: D142–D147.
- Maxwell, D. P., Nickels, R., McIntosh, L. (2002)** Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J.* 29: 269-279.
- McMullen, M., Jones, R., Gallenberg, D. (1997)** Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348.
- Meiss, E., Konno, H., Groth, G., et al. (2008)** Molecular processes of inhibition and stimulation of ATP synthase caused by the phytotoxin tentoxin. *Journal of Biological Chemistry* 283 (36): 24594-24599.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Schilling, A.G. (2000)** Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *J. Plant Dis. Protect.* 107: 124–134
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T.W., Tudzynski, B. (2003)** AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* 47: 975–991.
- Miller, J. D., Blackwell, B. A. (1986)** Biosynthesis of 3-acetyldeoxynivalenol and other metabolites by *Fusarium culmorum* HLX 1503 in a stirred jar fermentor. *Canadian Journal of Botany*, 1986, 64(1): 1-5.
- Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001)** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-99.
- Møller, I.M. (2001)** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561–591.

- Naton, B., Hahlbrock, K., Schmelzer, E. (1996)** Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol.* 112: 433–444.
- Nakayama, N., Takemae, A., Shoun, H. (1996)** Cytochrome P450foxy, a catalytically self-sufficient fatty acid hydroxylase of the fungus *Fusarium oxysporum*. *J. Biochem.* 119: 435–440.
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Eston, G. W., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., Joyce, D. (1998)** Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53: 17-37.
- Norman, E. G., Walton, A. B., Turpin, D. H. (1994)** Immediate activation of respiration in *Petroselinum crispum*, L. in response to the *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* elicitor. *Plant Physiol.* 106: 1541–1546.
- Nützmann, H.- W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., et al. (2011)** Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 14282–14287.
- Osborn, M. J. (1969)** Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Annu. Rev. Biochem.*, 38: 501-538.
- Osumi, M. (1998)** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29: 207-33.
- Paper, J.M., Scott-Craig, J.S., Adhikari, N.D., Cuomo, C.A., Walton, J.D. (2007)** Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Proteomics* 7: 3171-3183.
- Paulitz, T. C. (1999)** Fusarium head blight: a re-emerging disease. *Phytoprotection*, 80: 127-133.
- Payne, G. A., Brown, M. P. (1998)** Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 329–262.
- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A., Scala, A. (1999)** Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *J. Biol. Chem.* 274: 24959-24964.
- Pazzagli, L., Seidl-Seiboth, V., Barsottini, M., Vargas, W.A., Scala, A., Mukherjee, P.K., (2014)** Cerato-platanins: elicitors and effectors. *Plant Sci.* 228: 79-87.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011)** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8:785-786.

- Prescott, A. G. (1993)** A dilemma of dioxygenases: or where molecular biology and biochemistry fail to meet. *J. Ex. Bot.* 44: 849-861.
- Price, M. S., Yu, J., Nierman, W. C., Kim, H. S., Pritchard, B., Jacobus, C. A., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A. (2006)** The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol. Lett.* 255: 275-279.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. (1995)** Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8: 593-601.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., Pócsi, I. (2015)** Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front. Plant Sci.* 6:573.
- Quarantin, A., Glasenapp, A., Schäfer, W., Favaron, F., Sella, L. (2016)** Involvement of the *Fusarium graminearum* cerato-platanin proteins in fungal growth and plant infection. *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 220-229.
- Ren, Q., Chen, K., Paulsen, I. T. (2007)** TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Research* 35: D274-279.
- Repaske, R. (1958)** Lysis of gram-negative organisms and the role of versene. *Biochim. Biophys. Acta*, 30: 225-232.
- Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F. M. (2005)** Effect of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food addit. Contam.* 22: 369-378.
- Scharte, J., Schön, H., Weis, E. (2005)** Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* 28: 1421–1435.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. P. (1998)** SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS*, 95(11): 5857-5864.
- Schroeder, H.W., Christensen, J.J. (1963)** Factors Affecting Resistance of Wheat to Scab Caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838.
- Seunghoon, L., Hokyoung, S., Jungkwan, L., Kyunghun, M., Gyung, J. C., Jin-Cheol, K., Yin-Won, L. (2011)** Functional Analyses of Two Acetyl Coenzyme A Synthetases in the Ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryotic Cell*, 10(8): 1043–1052.

- Shah, P., Atwood, J. A., Orlando, R., El, M. H., Podila, G. K., Davis, M. R. (2009)** Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *Journal of Proteome Research* 8: 1123-1130.
- Shah, P., Gutierrez-Sanchez, G., Orlando, R., Bergmann, C. (2009)** A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics* 9: 3126-3135.
- Shaaban, M. I., Bok, J. W., Lauer, C., Keller, N. P. (2010)** Suppressor mutagenesis identifies a Velvet complex mediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot Cell* 9: 1816–1824.
- Sharma, M. et al. (2016)** Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. *Sci. Rep.* 6: 37353; doi: 10.1038/srep37353.
- Shoun, H., Tanimoto, T. (1991)** Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P450 in the respiratory nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* 266 (17): 11078–11082.
- Shwab, E. K., Keller, N. P. (2007)** Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research* 112: 225-230.
- Sieber, C. M. K., Lee, W., Wong, P., Münsterkötter, M., Mewes, H.- W., et al. (2014)** The *Fusarium graminearum* Genome Reveals More Secondary Metabolite Gene Clusters and Hints of Horizontal Gene Transfer. *PLoS ONE* 9(10): e110311.
- Stergiopoulos, I. & de Wit, p. J. (2009)** Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* 47: 233-263.
- Takaoka, S., Kurata, M., Harimoto, y., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Tsuge, T. (2014)** Complex regulation of secondary metabolism controlling pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *New Phytologist*, 202: 1297-1309.
- Talbot, N. J. (2003)** On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* 57: 177-202.
- Teixeira, M. C., Monteiro, P. T., Guerreiro, J. F., Gonçalves, J. P., Mira, N. P., et al. (2014)** The YEASTRACT database: an upgraded information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 42: D161–D166.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., et al. (1995)** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 14: 779–790.

- Van Gorcom, R. F. M., Boschloo, J. G., Kuijvenhoven, A., Lange, J., Van Vark, A. J., Bos, C. J., Van Balken, J. A. M., Pouwels, P. H., Van den Hondel, C. A. M. J. J. (1990)** Isolation and molecular characterisation of the benzoate-para-hydroxylase gene (bphA) of *Aspergillus niger*. A member of a new gene family of the cytochrome P450 superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 223: 192–197.
- Vanlerberghe, G. C. (2013)** Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6805-6847.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1994)** Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: studies with the alternative oxidase gene in tobacco. *Plant Physiol.* 105: 867-74.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1996)** Signals regulating the expression of nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol.* 111: 589-595.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1997)** Alternative Oxidase: From Gene to Function. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 703-34.
- Vanlerberghe, G. C., Say, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E., McIntosh, L. (1995)** Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiol.* 109: 353-361.
- van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006)** Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Vesonder, R. F., Gasdorf, H., Peterson, R. E. (1993)** Comparison of the cytotoxicities of *Fusarium* metabolites and *Alternaria* metabolite AAL-toxin to cultured mammalian cell lines. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24:473–477.
- Voigt, C. A., Schäfer, W., Salomon, S. (2005)** A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal*, 42: 364-375.
- Voigt, C. A., von Scheidt, B., Gacser, A., Kassner, H., Lieberei, R., Schäfer, W., et al. (2007)** Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *European journal of plant pathology*, 117: 1-12.
- Walker, S. L., Leath, S., Hagler, W. M., Jr., Murphy, J. P. (2001)** Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. *Plant Dis.* 85: 404-410.

- Walsh, C.T. (2004)** Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility. *Science* 303: 1805–1810.
- Walton, J. D. (1996)** Host-selective toxins: agents of compatibility. *The Plant Cell* 8(10): 1723-1733.
- Wang, Y.-M., Liu, J.-B., Peng, S.-Q. (2009)** Effects of *Fusarium* Mycotoxin Butenolide on Myocardial Mitochondria In Vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 19: 79-85.
- Wang, Y.-M., Peng, S.-Q., Zhou, Q., Wang, M.-W., Yan, C.-H., Yang, H.-Y., Wang, G.-Q. (2006)** Depletion of intracellular glutathione mediates butenolide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Toxicology Letters* 164: 231-238.
- Wang, Y.-M., Peng, S.-Q., Zhou, Q., Wang, M.-W., Yan, C.-H., Wang, G.-Q., Yang, H.-Y. (2007)** The oxidative damage of butenolide to isolated erythrocyte membranes. *Toxicology in Vitro* 21: 863-869.
- Weltring, K. M., Turgeon, B. G., Yoder, O. C., VanEtten, H. D. (1988)** Isolation of a phytoalexin-detoxification gene from the plant pathogenic fungus *Nectria haematococca* by detecting its expression in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 68: 335–344.
- Wilson, L.M., Idnurm, A., Howlett, B.J. (2002)** Characterization of a gene (sp1) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* 3: 487-493.
- Woloshuk, C.P., Foutz, K.R., Brewer, J.F., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Payne, G.A. (1994)** Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 60: 2408–2414.
- Wosten, H. A. (2001)** Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu.Rev. Microbiol.* 55: 625-646.
- Yang, F. Y. (2006)** Keshan disease and mitochondrial cardiomyopathy. *Sci.China C. Life Sci.* 49: 513–518.
- Yang, G., Rose, M.S., Turgeon, B.G., Yoder, O.C. (1996)** A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *Plant Cell* 8: 2139–2150.
- Yang, T. S. (1992)** Myocardial metabolic derangement of Keshan disease (KD). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24: 42.
- Yates, S.G., Tookey, H.L., Ellis, J.J., Burkhardt, H.J. (1967)** Toxic butenolide produced by *Fusarium nivale* (Fries) Cesati isolated from tall fescue (*Festuca arundinaceae* Schreb.). *Tetrahedron Lett.* 7: 621–625.

- Yin, L., Wang, P., Li, M., Ke, X., Li, C., Liang, D., Wu, S., Ma, X., Li, C., Zou, Y., Ma, F. (2013)** Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch. *J. Pineal Res.* 54: 426–434.
- Yu, J. H., Butchko, R. A., Fernandes, M., Keller, N. P., Leonard, T. J., Adams, T. H. (1996)** Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet.* 29: 549–555.
- Yu, J. H., Keller, N. P. (2005)** Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 437–458.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F. (1974)** A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14: 415–421.
- Zhang, D.-D., Wang, X.-Y., Chen, J.-Y., Kong, Z.-Q., Gui, Y.-J., Li, N.-Y., Bao, Y.-M., Dai, X.-F. (2016)** Identification and characterization of a pathogenicity-related gene *VdCYP1* from *Verticillium dahlia*. *Scientific Reports.* 6:27979
- Zhang, W. X., Yin, X. Y., Liu, H., Chi, Y. M., Yu, W. H. (2001)** Experimental study of myocardial injury induced by T-2 toxin. *Chin. J. Endemiol.* (in Chinese) 20: 28–30.
- Zhao, D., Feng, Q., Yan, X., Li, C., Pan, Y., Cui, Q. (1993)** Ultrastructural study of moniliformin induced lesions of myocardium in rats and mice. *Biomed. Environ. Sci.* 6: 37–44.

8. Anhang

8.1 Überprüfung spezifischer Primer für das Butenolid-Cluster unter Verwendung von gDNA und cDNA einer 3 Tage *in vitro* Kultur

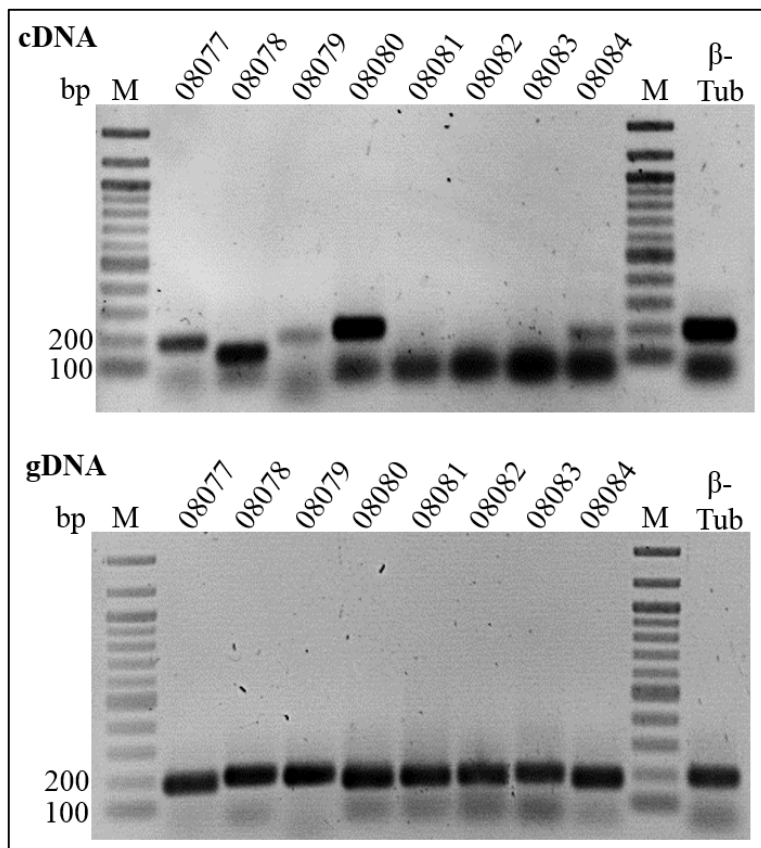


Abb. 49: PCR mit Clusterspezifischen Primern. Oben: cDNA, isoliert aus Myzel einer *in vitro* Kultur (3 Tage alt), diente als Template für eine PCR. Unten: Überprüfung der Clusterspezifischen Primer hinsichtlich ihrer Funktionalität und richtiger Größe der Amplifikate. Erwartete Größen cDNA und gDNA: FGSG_08077:183 bp; FGSG_08078: 197 bp; FGSG_08079: 197 bp; FGSG_08080: 181 bp; FGSG_08081:190 bp; FGSG_08082: 190 bp; FGSG_08083: 198 bp; FGSG_08084: 185 bp. Die Primer für FGSG_08078 amplifizieren mit gDNA als Template ein Fragment mit einem ca. 50 bp Intron; erwartetes Fragment bei gDNA: 247

8.2 Kurvenverläufe der Messungen der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter (A-D) und infizierter Spelzen (E-G)

8.2-A: Kontrolle (unbehandelte Spelzen), 180 min Inkubation in Assay-Medium

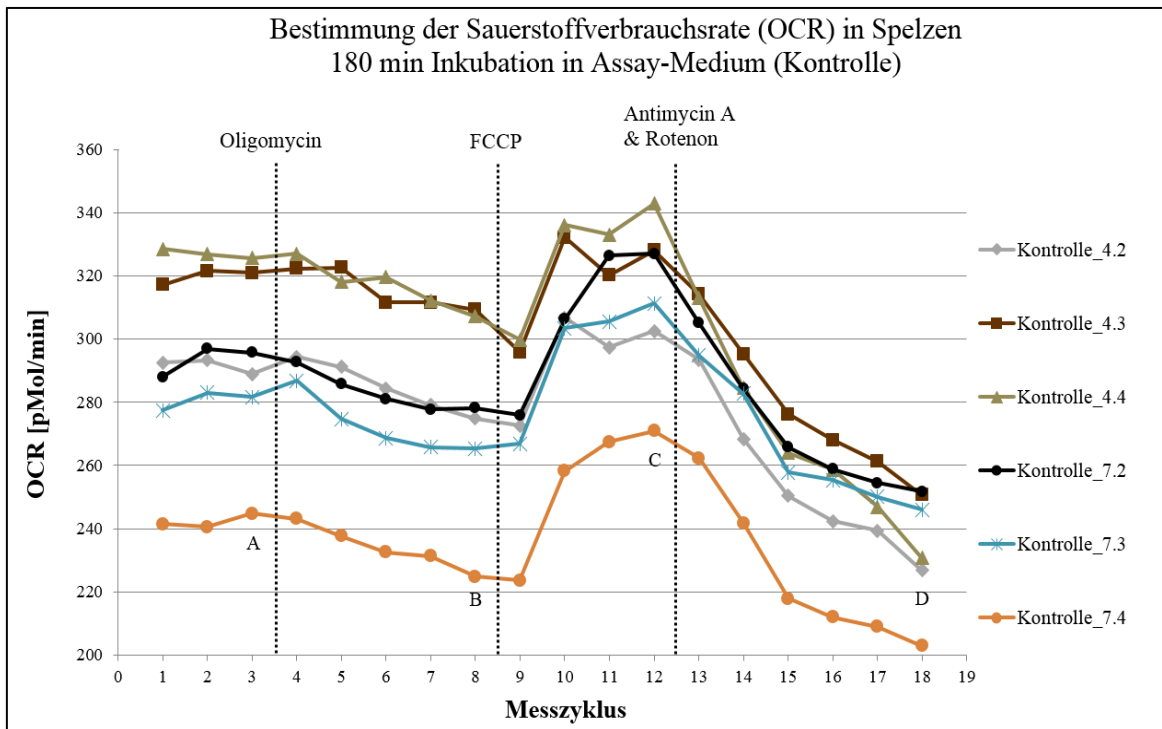


Abb. 50: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate unbehandelter Weizenvospelzen. Spelzen wurden mit 450 µl reinem Assay-Medium versetzt und für 180 min inkubiert. Es folgte die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR). Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

8.2-B: 30 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid

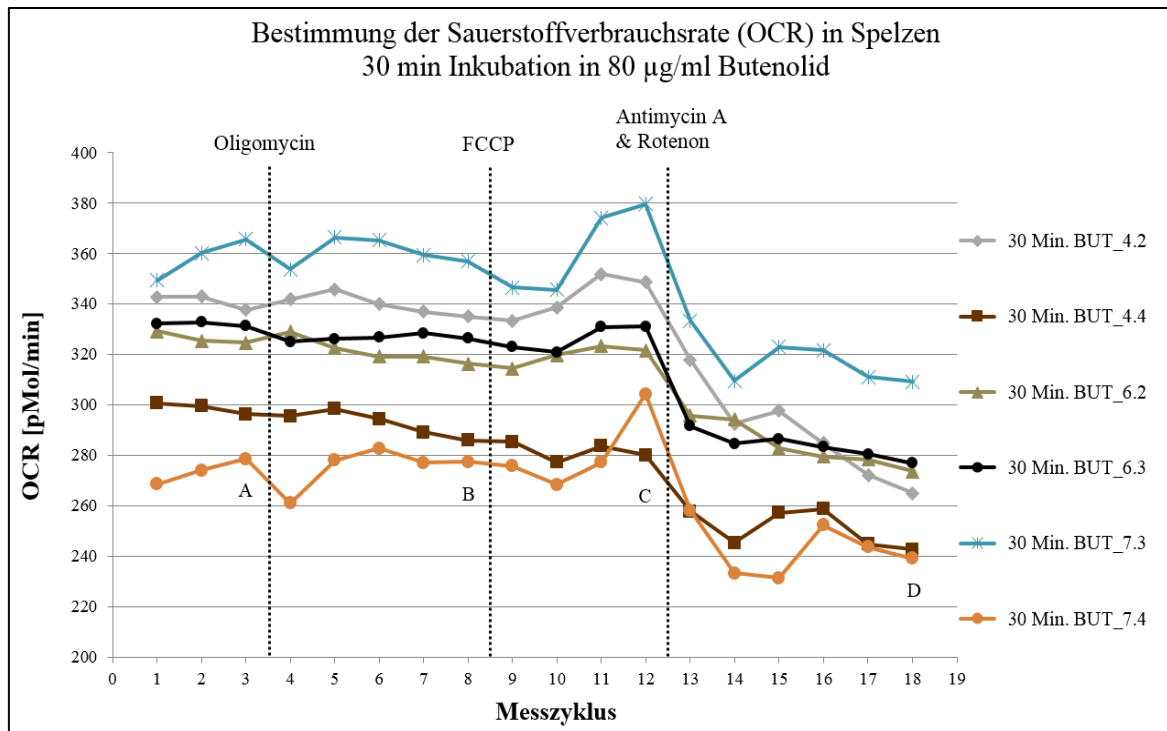


Abb. 51: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen, 30 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid. Spelzen wurden für 30 min in mit synthetischem Butenolid versetzten Assay Medium (Endkonz. 80 µg/ml) inkubiert. Es folgte die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

8.2-C: 60 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid

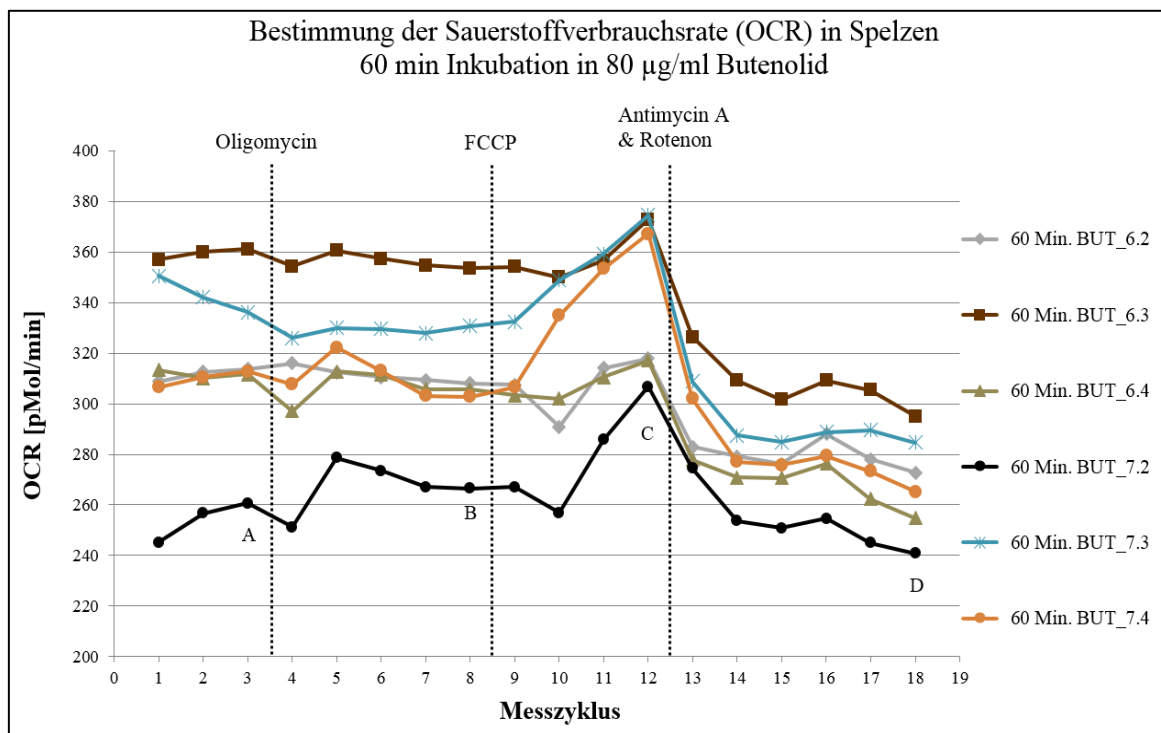


Abb. 52: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen, 60 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid. Spelzen wurden für 60 min in mit synthetischem Butenolid versetzten Assay Medium (Endkonz. 80 µg/ml) inkubiert. Es folgte die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplexspezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

8.2-D: 180 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid

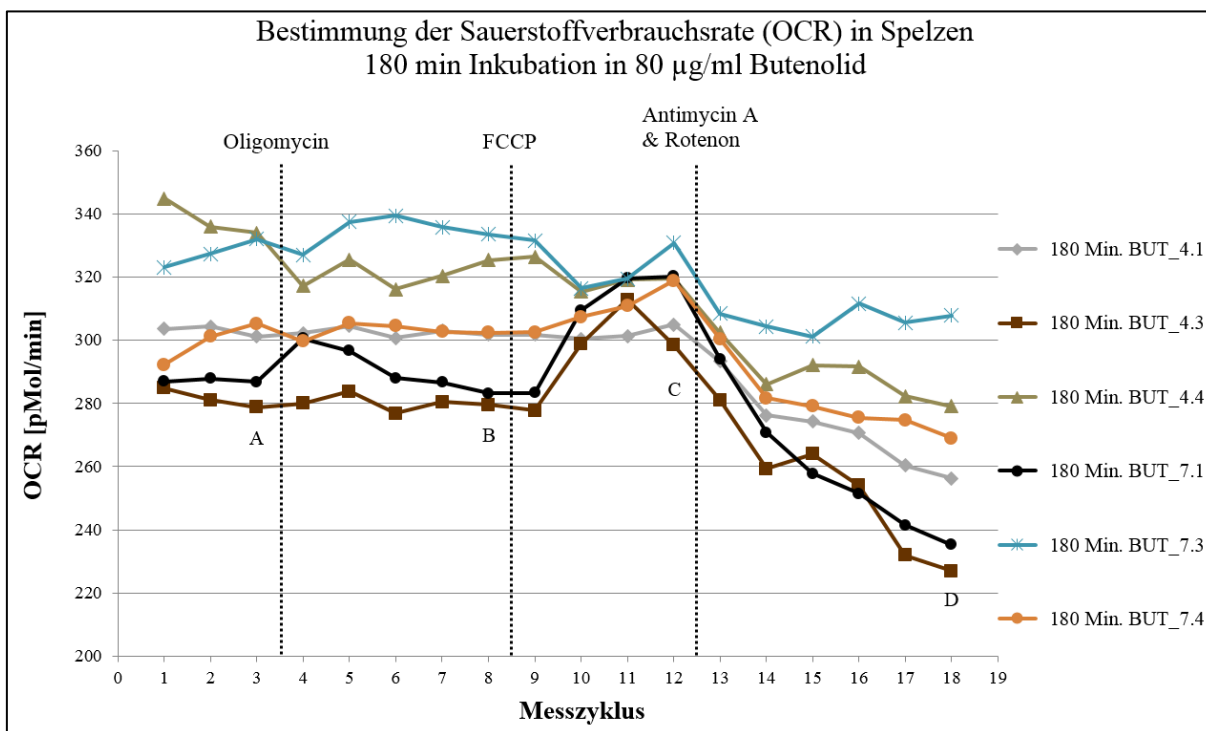


Abb. 53: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Butenolid-behandelter Weizenvorspelzen, 180 min Inkubation in 80 µg/ml Butenolid. Spelzen wurden für 180 min in mit synthetischem Butenolid versetzten Assay Medium (Endkonz. 80 µg/ml) inkubiert. Es folgte die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

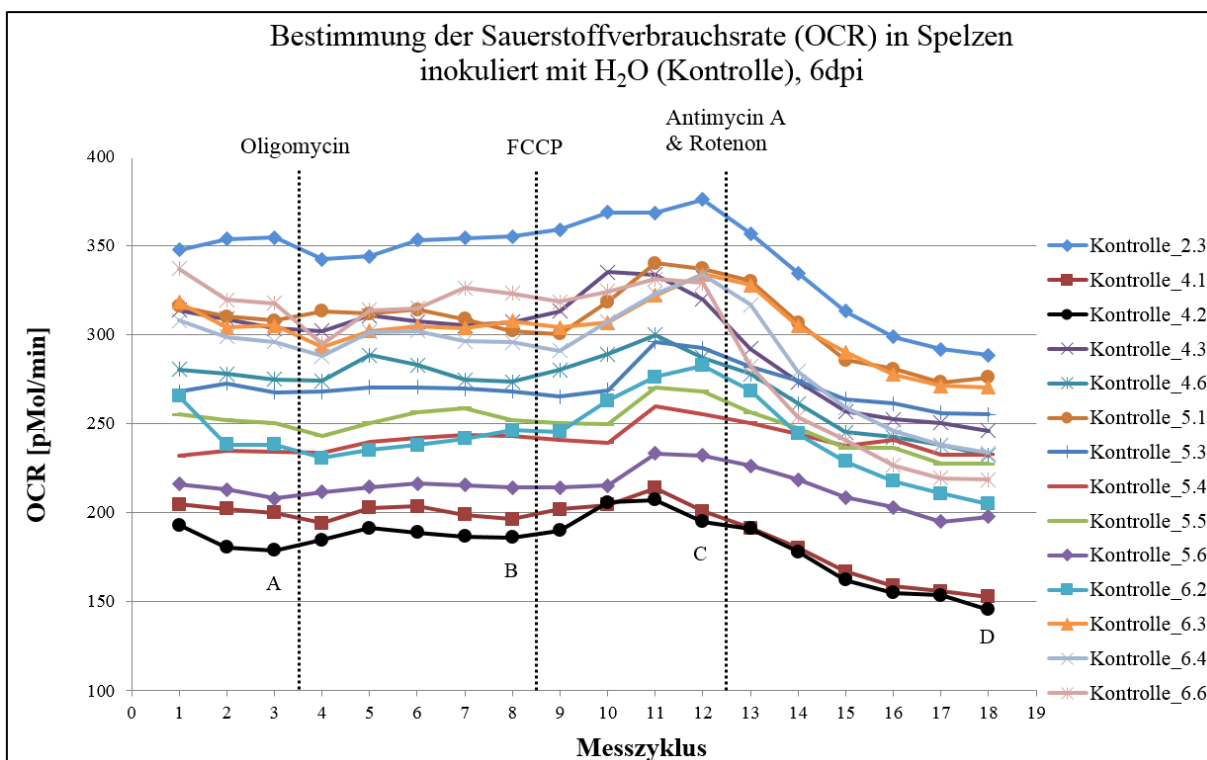
8.2-E: Kontrolle, Inokulation mit H₂O, 6 dpi

Abb. 54: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate Wasser inokulierter Weizenvorspelzen, 6 dpi. Spelzen wurden mit 5 µl sterilem H₂O inokuliert und für 6 Tage inkubiert. Es folgte die Zugabe von 450 µl Assay-Medium mit anschließender Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

8.2-F: Inokulation mit dem 8/1_DsRed Stamm, 6 dpi

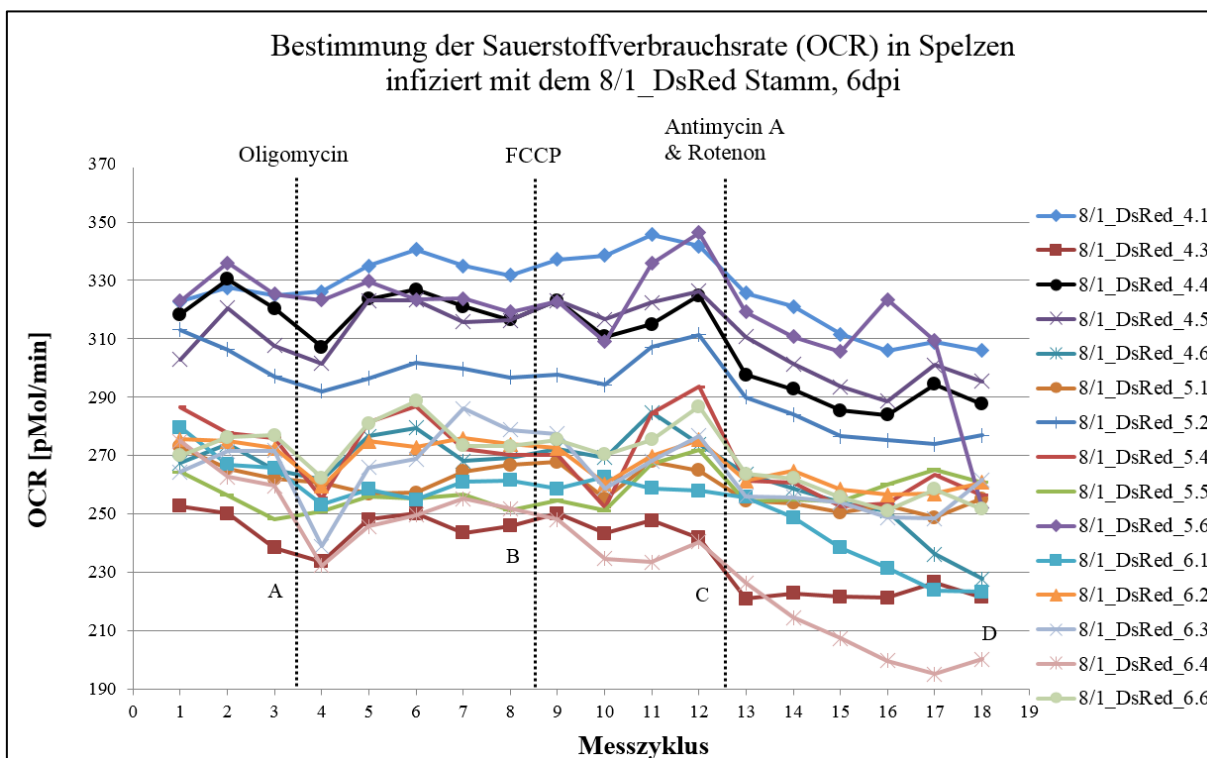


Abb. 55: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate von Weizenvorspelzen, inokuliert mit dem 8/1_DsRed Stamm, 6 dpi. Spelzen wurden mit 5 µl einer Konidiensuspension (20 Konidien/µl) des 8/1_DsRed Stammes inokuliert und für 6 Tage inkubiert. Es folgte die Zugabe von 450 µl Assay-Medium mit anschließender Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

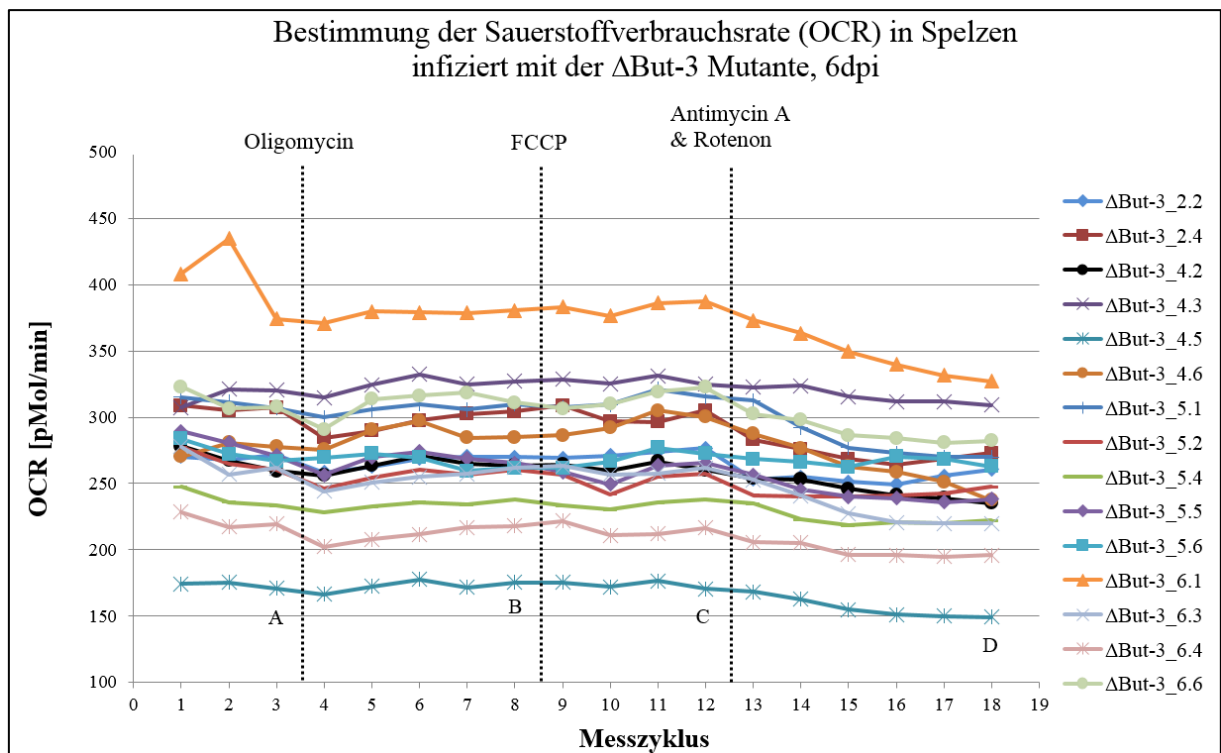
8.2-G: Inokulation mit der Δ But-3 Mutante, 6 dpi

Abb. 56: Untersuchung der Sauerstoffverbrauchsrate von Weizenvorspelzen, inokuliert mit der Δ But-3 Mutante, 6 dpi. Spelzen wurden mit 5 μ l einer Konidiensuspension (20 Konidien/ μ l) der Δ But-3 Mutante inokuliert und für 6 Tage inkubiert. Es folgte die Zugabe von 450 μ l Assay-Medium mit anschließender Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. oxygen consumption rate, OCR) ohne Wirkstoffzugabe. Zu festgelegten Zeitpunkten (ca. 20 (Oligomycin), 80 (FCCP), 110 min (Antimycin & Rotenon) nach Beginn der Messung) wurde dem Assay-Medium die Komplex-spezifischen Inhibitoren zugesetzt und die OCR weiterhin bestimmt. Die Buchstaben A bis D zeigen die Messpunkte an, die für die spätere Berechnung einzelner Aspekte der Atmungskette verwendet wurden.

8.3 DON-Konzentrationen während der Weizeninfektion im Zeitverlauf

Tab. 21: Ergebnisse der LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON in infiziertem Pflanzenmaterial, normalisiert auf gemessene gDNA Konzentrationen. Inokulierte Weizenpflanzen wurden nach 1, 2, 3, 4 und 5 dpi geerntet. Aus ca. 20 mg Material wurde gDNA isoliert und mittels qRT-PCR die enthaltene Menge an Pilz gDNA bestimmt. 100 mg Material wurden für eine LC-MS/MS Analyse zur Bestimmung von DON verwendet und auf die enthaltene gDNA-Konzentration normalisiert. Pro verwendetem Stamm wurden 3 biologische Replikate untersucht.

Zeitpunkt	Replikatnr.	DON [mg/kg]	Zeitpunkt	Replikatnr.	DON [mg/kg]
0 dpi	1	0,00	3 dpi	1	337,85
	2	0,00		2	277,24
	3	0,00		3	116,78
1 dpi	1	0,00	4 dpi	1	222,06
	2	33,14		2	246,8
	3	0,00		3	221,24
2 dpi	1	259,95	5 dpi	1	353,98
	2	105,74		2	244,60
	3	152,79		3	188,23

8.4 Auswirkung der Lagerdauer von Spelzen bei 4 °C auf den Sauerstoffverbrauch

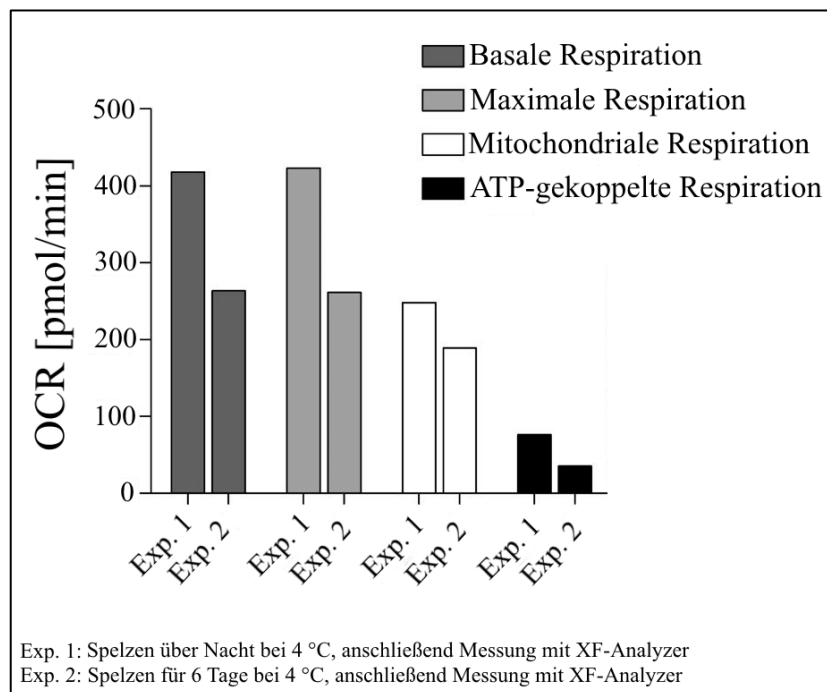


Abb. 57: Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate von Vorspelzen mit unterschiedlicher Lagerungsdauer. Präparierte Weizenvorspelzen wurden nach der Ankunft am Messort über Nacht oder für 6 Tage bei 4 °C gelagert und anschließend die Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) bestimmt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und mich wissenschaftlich betreut und gefördert hat. Ein weiterer Dank geht auch an Prof. Dr. Stefan Hoth für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jörg Bormann und Dr. Ana Lilia Martínez-Rocha, die mir während meiner gesamten Zeit immer gute Tipps, Tricks und Ratschläge erteilt haben. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich ebenfalls bei Birgit Haderer und Cathrin Kröger für die vielen Fragen, die sie mir- öfters als einmal- beantwortet, die Arbeit, die sie mir manchmal abgenommen haben. Aufbauende Worte, wenn etwas schiefgegangen ist, hattet ihr immer parat. Die oft geführten Gespräche über alltägliches oder das rumalbern auf dem Gang brachte etwas Abwechslung und Ablenkung.

Weiterhin möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre danken- ganz speziell meinen lieben Leidensgenossen Gunnar Baermann, Christine Blum, Annemarie Glöckner, Sophie Brandt, Lewin Günther, Tobias Hanack, Chien Hoàng und Michael Mentges, denen ich weiterhin alles Gute und viel Erfolg wünsche. Hierbei gilt mein besonderer Dank meinen Bürokollegen Sophie, Gunnar und Michi. Ohne euch drei wäre die Schreibtischarbeit, die Ergebnisse von Plattentests oder die sinnlose Betrachtung leerer oder skurriler Gelbilder nur halb so amüsant, bzw. richtig deprimierend gewesen- von der gDNA-Konzentrationsberechnung ganz zu Schweigen! (Ein Hoch auf das Eppitierchen...)

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner kleinen Schwester, die immer an mich geglaubt, mich die ganze Zeit unterstützt und- vor allem- ertragen haben, wenn meine Stimmung wieder einmal im Keller oder ich einfach nur launisch war.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Freund Thomas bedanken. Du hast dafür gesorgt, dass ich den Kopf frei bekomme, wenn es dringend notwendig war. Mein Gemecker und Gefluche hast du ertragen. Du hattest immer eine Schulter zum Anlehnen und Runterkommen für mich. Ich will gar nicht wissen, wie oft ich alles in die Ecke geworfen hätte, hätte ich die schöne Zeit mit dir nicht gehabt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den 17.10.17

Anika Glasenapp