

BIOTISCHE UND ABIOTISCHE FAKTOREN DER
INDUKTION DER TRICHOHECEN-BIOSYNTHESE DES
WEIZENPATHOGENS *Fusarium*
graminearum [SCHWABE]

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
DES FACHBEREICHS BIOLOGIE, DER FAKULTÄT FÜR MATHEMATIK,
INFORMATIK UND NATURWISSENSCHAFTEN,
DER UNIVERSITÄT HAMBURG



VORGELEGT VON
PETER ILGEN
AUS SIMMERN/HUNSRÜCK

Hamburg, 2010

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. W. Schäfer
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. A. Di Pietro
Tag der Disputation: 19. November 2010

Hamburg, den 04. November 2010



A. Temming

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

„Alles, was einen Anfang hat, hat
auch ein Ende - und meistens hat
das, was ein Ende hat, auch eine
Fortsetzung.“

(Sprichwort)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Das Getreidepathogen <i>Fusarium graminearum</i>	1
1.2. Die Mykotoxine von <i>F. graminearum</i>	4
1.3. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Verwendete Chemikalien und Gebrauchsmaterialien	9
2.2. Verwendete Software	9
2.3. Verwendete Organismen und Plasmide	9
2.3.1. <i>Fusarium graminearum</i>	9
2.3.2. <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.3. Weizen- und Maiskultivare	10
2.3.4. Verwendete Plasmide	10
2.4. Medien und Kulturbedingungen	12
2.4.1. Anzucht von <i>F. graminearum</i>	12
2.4.2. Gewinnung von <i>F. graminearum</i> -Konidien	13
2.4.3. Anzucht von <i>F. graminearum</i> auf unterschiedlichen Stickstoffquellen	14
2.4.4. Anzucht von <i>E. coli</i>	15
2.4.5. Anzucht der Weizen- und Maiskultivare	15
2.5. Molekularbiologische Methoden	16
2.5.1. Isolation von bakterieller Plasmid-DNA	16
2.5.2. Isolation pilzlicher genomischer DNA nach der CTAB-Methode . .	17
2.5.3. Isolierung von RNA aus pilzlichem und pflanzlichem Material . . .	18
2.5.4. DNA-Restriktion	18
2.5.5. Amplifizierung von DNA-Fragmenten	19
2.5.6. Fusions-PCR	19

Inhaltsverzeichnis

2.5.7. Reverse Transkription und semiquantitative PCR	20
2.5.8. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten	20
2.5.9. Transformation von <i>E. coli</i> durch "Heat Shock"	21
2.5.10. Transformation von <i>F. graminearum</i>	21
2.5.11. Selektion und Vereinzeln von putativen Transformanten	24
2.5.12. Southern-Blot-Analyse	24
2.6. Infektionsversuche von Weizenpflanzen (<i>T. aestivum</i> L.)	31
2.7. Infektionsversuche von Maispflanzen (<i>Z. mays</i> L.)	31
2.8. Screening auf <i>TRI5</i> -induktive Substanzen	31
2.8.1. Messung des DON-Gehaltes	33
2.9. Isolierung von Extrakten aus pflanzlichen Geweben	34
2.9.1. Aufarbeitung und Isolierung von Extrakten aus infizierten Weizenähren	34
2.9.2. HPLC/MS-Analyse	34
2.9.3. Aufarbeitung und Isolierung von Substanzen aus Weizen- und Maiskörnern	35
2.9.4. Definierte Isolierung von Speicherproteinen aus Weizen und Mais	36
2.9.5. SDS-PAGE	37
2.10. Fluoreszenzmikroskopie	39
3. Ergebnisse	41
3.1. Klonierung und Verifizierung des GFP-Reporterstammes	41
3.2. Histologie infizierter Weizenähren	49
3.2.1. <i>TRI5</i> zeigt eine gewebespezifische Induktion	49
3.3. Screening auf <i>TRI5</i> -induktive Substanzen	57
3.3.1. Trichotheceninduktion durch pflanzliche Extrakte	63
3.3.2. HPLC/MS Analysen von infizierten Weizenähren	66
3.3.3. Isolierung alkoholischer Extrakte aus Weizen- und Maiskörnern	70
3.4. Wachstum auf Agarplatten unterschiedlicher Medien	73
3.5. Die Kohlenstoffquelle hat einen Einfluss auf die <i>TRI5</i> -Induktion	79
3.6. Methionin Sulfoximin hemmt spezifisch die Glutamin-Synthetase und unterdrückt die <i>TRI5</i> -Induktion	85
3.7. Ammonium führt zu einer Änderung des Myzelwachstums	90
4. Diskussion	94
4.1. Die Toxinbiosynthese unterliegt einer strikten Regulation <i>in planta</i>	94
4.1.1. Der Reporterstamm zeigt ein wildtypähnliches Verhalten	94

Inhaltsverzeichnis

4.1.2. Infektionstests auf Pflanzen zeigen eine gewebespezifische <i>TRI5</i> -Induktion	95
4.2. Bioimaging der <i>TRI5</i> -Induktion in Minikulturen	97
4.3. Versuch der Identifizierung der <i>TRI5</i> -induktiven Komponenten aus pflanzlichem Material	100
4.3.1. Rohextrakte aus Rachisknoten induzieren GFP	100
4.3.2. Speicherproteine aus Weizen und Mais induzieren die Toxinproduktion	102
4.4. Nährstoffabhängige Regulation von Stoffwechselgenen in filamentösen Pilzen	105
4.5. Stickstoff reguliert den Sekundärmetabolismus von <i>Fusarium graminearum</i>	109
4.6. Stickstoff reguliert die Expression von Virulenzgenen in <i>Fusarium spec.</i> . .	113
4.6.1. Ammonium induziert die Expression von <i>TRI5</i>	113
4.6.2. Ammonium nimmt Einfluss auf die Hyphenmorphologie	117
4.7. Abschließende Betrachtung	121
4.8. Ausblick	125
5. Zusammenfassung	126
Literaturverzeichnis	128
6. Abkürzungsverzeichnis	142
A. Anhang	144

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schemazeichnung des Aufbaus eines Weizenährchens	2
1.2. Der Lebenszyklus von <i>F. graminearum</i>	3
1.3. Struktur ausgewählter Trichothecene	4
1.4. Der Trichothecen-Gencluster von <i>F. graminearum</i>	5
1.5. Der Biosyntheseweg der Trichothecene	6
2.1. PCR-Produkt von β - <i>Tubulin</i> nach unterschiedlich vielen PCR-Zyklen . . .	20
2.2. Schematischer Aufbau des Southern-Blots	26
2.3. Flußdiagramm der Gewinnung von Extrakten aus Weizenähren	35
3.1. Southern-Blot-Analyse der Primär- und Sekundärtransformanten	42
3.2. Klonierung des GFP/DsRed Reporterstammes	43
3.3. Verhalten des Reporterstammes auf Weizen	44
3.4. Verhalten des Reporterstammes auf Mais	45
3.5. Fluoreszenzbilder des Reporterstammes in MM mit 0,2 M Ammoniumsulfat	46
3.6. Semiquantitative PCR und DON-Messung der Kulturen in MM mit 0,2 M Ammoniumsulfat	47
3.7. Fluoreszenzbilder von <i>TRI5</i> Prom:: <i>GFP</i> -infizierten Weizenährchen (cv. <i>Nandu</i>)	50
3.8. Expression von <i>TRI5</i> in der Karyopse, 3 dpi	51
3.9. GFP-Induktion in Parenchymzellen der Rachis, 5 dpi	53
3.10. Längsschnitt durch die Rachis unterhalb des infizierten Ährchens, 4 dpi .	54
3.11. Fluoreszenzbilder späterer Infektionsstadien	55
3.12. Expression von <i>TRI5</i> im Rachisknoten und der Rachis	56
3.13. Fluoreszenzmessung von Minikulturen in Minimalmedium	58
3.14. Fluoreszenzmessung von Minikulturen in Kompletmedium	59
3.15. Fluoreszenzmessung von Minikulturen in GYEP-Medium	60
3.16. Messung der DON-Konzentration in infiziertem Weizengewebe	63

Abbildungsverzeichnis

3.17. Fluoreszenzmessung von Extrakten aus H ₂ O- und <i>Fg</i> 8/1-infizierter Rachis in GYEP	64
3.18. Fluoreszenzbilder von Minikulturen in GYEP mit H ₂ O-Extrakten aus getrennt isolierten Rachisknoten und Rachis, 48 h	65
3.19. UV-Chromatogramme bei 300 nm des EtOH-Extraktes aus <i>F. graminearum</i> und Wasser inokulierten Weizenährchen	67
3.20. Extrahierte Ionenchromatogramme für die isolierte Masse von 119 m/z korrelierend für <i>p</i> -Cumarinsäure	68
3.21. Massenspektren von Rt 5,927 (I) und <i>p</i> -Cumarinsäure, sowie deren UV-Chromatogramme im direkten Vergleich	69
3.22. Fluoreszenzbilder von Minikulturen in GYEP mit Maisextrakt (55% Iso-propanol), 48 h	70
3.23. SDS-PAGE isolierter Speicherproteine aus Weizen und Mais	71
3.24. Phänotyp von <i>F. graminearum</i> auf MM _{mod.} -Agarplatten und CaNO ₃ als N-Quelle	74
3.25. Phänotyp von <i>F. graminearum</i> auf MM _{mod.} -Agarplatten und (NH ₄) ₂ SO ₄ als N-Quelle, 5 dpi	75
3.26. Phänotyp von <i>F. graminearum</i> auf MM _{mod.} -Agarplatten und NH ₄ Cl als N-Quelle, 5 dpi	76
3.27. Phänotyp des <i>TRI5</i> Prom:: <i>GFP</i> -Reporterstammes auf MM _{mod.} -Agar mit Ammonium und Nitrat (je 5 mM) als N-Quelle, 4 dpi	77
3.28. <i>TRI5</i> -Induktion von <i>TRI5</i> Prom:: <i>GFP</i> auf MM _{mod.} -Agarplatten und (NH ₄) ₂ SO ₄ als N-Quelle	79
3.29. Fluoreszenzmessungen von <i>GFP</i> und <i>DsRed</i> in Minikulturen in MM _{mod.} flüssig mit Vitalkleber und Saccharose bzw. Glc/Frc-Mix	81
3.30. Fluoreszenzmessungen von <i>GFP</i> und <i>DsRed</i> in Minikulturen in MM _{mod.} flüssig mit Vitalkleber und Glucose bzw. Fructose	82
3.31. <i>TRI5</i> -Induktion in Minikulturen in MM _{mod.} flüssig mit Vitalkleber als N-Quelle und unterschiedlichen Zuckern, 72 h	83
3.32. Phänotyp von <i>F. graminearum</i> auf CM _{mod.} -Agarplatten mit versch. N-Quellen	86
3.33. Flüssigkulturen in MM _{mod.} mit versch. Stickstoffquellen und MSX nach 0 h, 24 h und 48 h	87
3.34. Expression von <i>TRI5</i> und <i>TRI4</i> in Minikulturen in GYEP mit Maisextrakt ohne und mit MSX, 4 dpi	88
3.35. DON-Assay von Minikulturen in GYEP mit Maisextrakt und MSX, 4 dpi	89

Abbildungsverzeichnis

3.36. Detailaufnahme der Myzelmorphologie auf MM _{mod.} -Agar, Saccharose mit 5 mM AS, 6 dpi	90
3.37. Überblick über die Hyphenmorphologie einer Kultur auf MM _{mod.} -Agar, Saccharose mit 5 mM AS, 4 dpi	91
3.38. Detailaufnahme der Myzelmorphologie auf MM _{mod.} -Agar, Saccharose mit 5 mM AS, 4 dpi	92
4.1. Übersicht der Speicherproteine aus Weizen und Mais	103
4.2. Postuliertes Modell der Stickstoffregulation	108
4.3. Modifiziertes und stark vereinfachtes Modell der Signaltransduktion unter Ammonium-Bedingungen	122
4.4. Modifiziertes und stark vereinfachtes Modell der Signaltransduktion unter Nitrat-Bedingungen	123
A.1. Plasmidkarte von pTRI5GFP	144
A.2. Plasmidkarte von pII99DsRed	145
A.3. Verwendeter Proteinmarker peqGOLD	147
A.4. Ionenchromatogramm, UV-Spektrum und Massenspektrum des Peaks II aus Abb. 3.20	148
A.5. Ionenchromatogramme der Extrakte aus infizierten Ähren und der Kontrolle	149
A.6. Phänotyp des <i>TRI5</i> Prom:: <i>GFP</i> -Reporterstammes auf MM _{mod.} -Agar mit Ammonium und Nitrat (je 5 mM) als N-Quelle, 5 dpi	150
A.7. Myzelwachstum auf MM _{mod.} mit 5 mM AS sowie 300 µg/mL MSX, 5 dpi	151
A.8. Detailaufnahme der Myzelmorphologie auf MM _{mod.} -Agar, Saccharose mit 5mM AS, 4 dpi	152
A.9. Myzelwachstum auf MM _{mod.} mit 5 mM CaNO ₃ bzw. (NH ₄) ₂ SO ₄ sowie 50 ng/mL Rapamycin, 5 dpi	153

Tabellenverzeichnis

2.1. Getestete Substanzen	32
2.2. Fluoreszenzfilter der verwendeten Mikroskope	40
A.1. Primersequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer	146

1. Einleitung

1.1. Das Getreidepathogen *Fusarium graminearum*

Der phytopathogene Askomyzet *Fusarium graminearum* ist der Hauptauslöser der Ährenbleiche (*Fusarium* Head Blight, FHB) bei Weizen (*Triticum aestivum*) und anderen kleinkörnigen Nutzpflanzen, wie Gerste (*Hordeum vulgare*) und Hafer (*Avena sativa*) sowie der Kolbenfäule von Mais (*Zea mays*). Ein Befall dieser Nutzpflanzen führt zu einem hohen Ernteverlust, nicht nur durch eine Reduktion des Ertrages, sondern auch durch eine verminderte Qualität des geernteten Korns (Goswami und Kistler, 2004; Desjardins *et al.*, 1996). Laut einer Studie kam es in den USA in den Jahren von 1998 bis 2000 durch FHB zu einem Verlust von 870 Millionen Dollar; die Autoren schätzen den Gesamtschaden auch durch sekundäre ökonomische Verluste auf 2,7 Milliarden Dollar (Nganje *et al.*, 2001). Zusätzlich zu diesen offensichtlichen Einbußen kann es zu einer Kontamination des Getreides und seiner Produkte durch eine Reihe von Mykotoxinen kommen, die für Mensch und Tier lebensgefährliche Konzentrationen erreichen können (Marasas *et al.*, 1984). Aufgrund dieser Tatsache haben viele Länder einen Maximalwert für Mykotoxinkonzentrationen in fertigen Getreideprodukten festgelegt. So wurde die TDI (tolerable daily intake) Dosis für das Trichothecen Deoxynivalenol (DON) in der Europäischen Union und in den USA auf 1 ppm festgelegt (van Egmond *et al.*, 2007).

Der Lebenszyklus von *F. graminearum* beginnt in der Regel mit Makrokonidien oder Askosporen, wobei aber auch eine Verbreitung durch einzelne, lebensfähige Myzelstücke erfolgen kann. Die Ährenbleiche tritt besonders in regenreichen und warmen Sommern auf, denn sie bieten die perfekten Bedingungen für die Keimung der Konidien und den Befall der Wirtspflanze. Wie die Konidien auf die jeweilige Wirtspflanze gelangen ist immer noch Diskussionsgegenstand, aber möglicherweise werden sie durch Spritzwasser in ihrer Umgebung verteilt (Sutton, 1982; Goswami und Kistler, 2004; Trail, 2009). Auf den Wirten keimen die Konidien aus und gelangen während des Zeitpunktes der Blüte in die Ährchen. Zu diesem Zeitpunkt brechen die Antheren aus den Blütenhüllblättern nach Außen und öffnen damit den weiteren Infektionsweg für die wachsenden Hyphen. Der hohe Anteil an Cholin und Betain in den Antheren bewirkt dabei ein gerichtetes Wachstum der Pilzhypen in Richtung der offenen Blüte (Strange *et al.*, 1974; Strange und Smith, 1971). Hat das Myzel das Innere der Blüte erreicht, kolonisiert das Pathogen zuerst die sich entwickelnde Karyopse und den Blütenboden. Diese Gewebe sind die Eintrittspforten

1. Einleitung

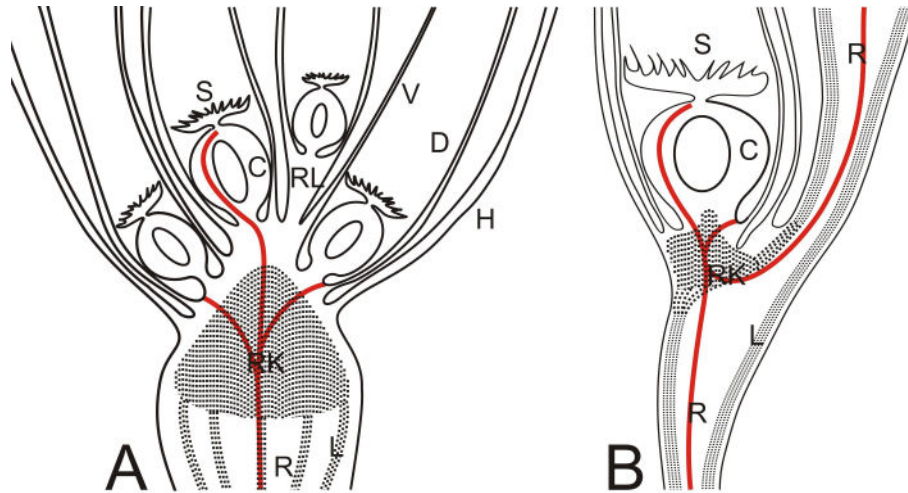


Abbildung 1.1.: Schemazeichnung des Aufbaus eines Weizenährchens im frontalen (A) und im sagittalen Längsschnitt (B). Die Rachis (R) ist der zentrale Teil der Weizenähre, an dem die einzelnen Ährchen sitzen und der von den Leitbündeln (L) durchzogen ist. Der Bereich, in dem die einzelnen Ährchen an der Rachis sitzen, wird als Rachisknoten (RK) bezeichnet. Hier verzweigen sich die Leitbündel in solche, die höherliegende Ährchen versorgen und solche, die in das angrenzende Ährchen abzweigen. Ein typisches Weizenährchen setzt sich aus vier bis fünf einzelnen Blüten zusammen deren äußeres Paar von der Hüllspelze (H) bedeckt wird. Darauf folgen die Deck- (D) und die Vorspelze (V). Die letzteren hüllen die Karyopse (C) mit der Narbe (Stigma, S) ein. Die inneren Blüten werden durch die Rachilla (RL) mit Nährstoffen versorgt. Die roten Linien verdeutlichen den Infektionsweg von *F. graminearum* in der einzelnen Blüte und seine Ausbreitung in die Rachis. Modifiziert und erweitert nach Kang und Buchenauer (2000).

durch die sich *F. graminearum* in dem Ährchen etabliert und von hier aus die gesamte Ähre befallen kann (Brown *et al.* , 2010; Jansen *et al.* , 2005).

Die Abbildung 1.1 zeigt eine Schemadarstellung eines einzelnen Ährchens in einem frontalen (A) und einem sagittalen (B) Längsschnitt. Die roten Linien zeigen den typischen Infektionsweg von *F. graminearum* in der Pflanze. Sowohl das Gewebe des Fruchtknotens (Karyopse), als auch der Blütenboden wurden als primäre Penetrationsstellen des Pilzes beschrieben (Brown *et al.* , 2010; Jansen *et al.* , 2005). Die weitere Ausbreitung des Pathogens in der Weizenähre erfolgt durch den Rachisknoten des infizierten Ährchens. Der Rachisknoten ist der Teil des Ährchens, mit dem es mit der Rachis verbunden ist und in dem sich die Leitbündel aus der Rachis verzweigen, um das am Rachisknoten sitzende Ährchen mit Wasser und Nährstoffen zu versorgen. Nach der Kolonisierung des Rachisknotens breitet sich das Pathogen entlang der Leitbündel und in den Extrazellularen der Parenchymzellen in apikaler und basaler Richtung in der gesamten Ähre aus. Dieses Stadium wird nach etwa drei bis vier Tagen der Infektion erreicht. In der darauf folgenden Zeit (sieben bis 14 Tage) breitet sich *F. graminearum* immer weiter aus und es kommt zu einem massiven Befall der Leitbündel (Brown *et al.* , 2010). Dieser Befall, zusammen

1. Einleitung

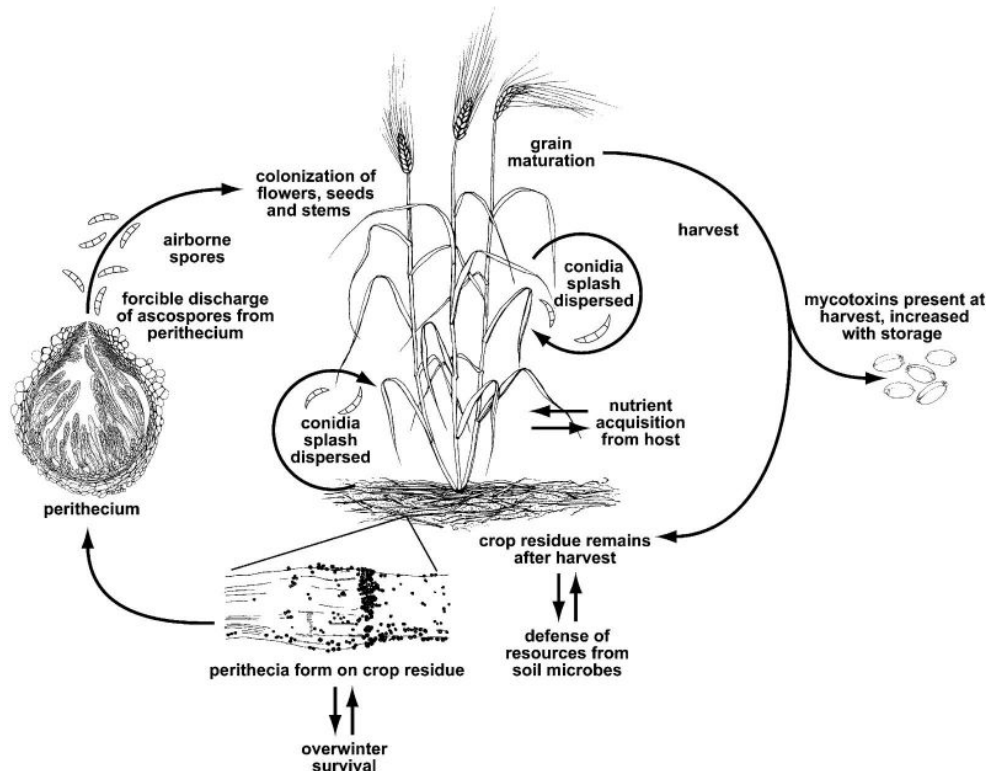
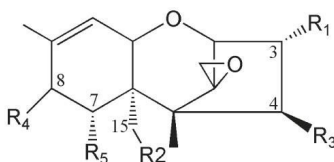


Abbildung 1.2.: Der Lebenszyklus von *F. graminearum* beginnt mit Askosporen oder Makrokonidien, die auf die Wirtspflanze gelangen und dort auskeimen. Von der Pflanzenoberseite aus infiziert *F. graminearum* die Blüte des Wirtes und kolonisiert von dort ausgehend die gesamte Pflanze. Auf der Oberseite der Wirtspflanze werden im asexuellen (*F. graminearum*) Stadium Makrokonidien gebildet, die eine weitere Infektion hervorrufen können oder im Boden überwintern. Das sexuelle Stadium (*Gibberella zeae*) findet sich oft auf den Ernterückständen (Stroh) und zeichnet sich durch die Formierung von Perithezien und darin durch die Produktion von Askosporen aus. Auch in dieser Form kann *F. graminearum* überwintern und im nächsten Jahr den Lebenszyklus von vorne beginnen. Abbildung entnommen aus Trail (2009).

mit der Sekretion von Mykotoxinen, führt zu einem Nährstoffmangel der Ähre sowie zum Absterben von Zellen: Die Symptome der Fusarien-Ährenbleiche werden sichtbar. Am Ende des Infektionszyklus, nach etwa drei Wochen, kommt es zur Bildung von neuen Konidien, die wiederum neue Wirtspflanzen befallen können (Guenther und Trail, 2005). Zu noch späteren Zeitpunkten, vorzugsweise auf dem von der Ernte übrig gebliebenen Stroh oder anderen Pflanzenresten, tritt *F. graminearum* in sein sexuelles Stadium ein und formt als *Gibberella zeae* Perithezien, in denen sich Askosporen entwickeln (siehe Abb. 1.2, (Trail, 2009)). Sowohl Konidien als auch Askosporen können als Überdauerungsorgane im Erdboden überwintern und stellen neue Infektionsherde für die nächste Generation der Wirtspflanzen dar.

1.2. Die Mykotoxine von *F. graminearum*

Die Gefahr, die von dem Pflanzenpathogen *F. graminearum* ausgeht, besteht nicht nur in einer Verminderung der Ernte durch weniger Kornansatz, sondern auch und vor allem in einer Kontamination der verbleibenden Körner mit Mykotoxinen. Viele der Gene, die am sekundären Metabolismus in Pilzen und somit an der Bildung von Toxinen und Pigmenten beteiligt sind, sind in sogenannten Genclustern organisiert. Hier liegen die Gene, die für an einem Syntheseweg beteiligte Proteine kodieren als auch Gene für genclusterspezifische Transkriptionsfaktoren in relativer räumlicher Nähe zueinander im Genom. Viele dieser Gencluster unterliegen einer hochgradigen Regulation und werden nur unter bestimmten Bedingungen transkribiert. Einige prominente Beispiele für solche Gencluster sind der Penicillin-Gencluster aus *Penicillium chrysogenum* (Díez *et al.*, 1990), der Aflatoxin-Gencluster aus *Aspergillus parasiticus* (Yu *et al.*, 2004) und der Aurofusarin-Gencluster aus *F. graminearum* (Malz *et al.*, 2005; Frandsen *et al.*, 2006). Die Pilze der *Fusarien*-Spezies synthetisieren eine große Bandbreite unterschiedlicher toxischer Verbindungen.



compound	substituents ^a				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
isotrichodermol	OH	H	H	H	H
isotrichodermin	OAc	H	H	H	H
calonectrin	OAc	OAc	H	H	H
scirpentriol	OH	OH	OH	H	H
15-acetoxyscirpenol	OH	OAc	OH	H	H
4,15-diacetoxyscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
T-2 toxin	OH	OAc	OAc	Oiso	H
deoxynivalenol	OH	OH	H	=O	OH
nivalenol	OH	OH	OH	=O	OH
4-acetylnivalenol	OH	OH	OAc	=O	OH

^a Ac, acetyl ester; Iso, isovaleryl ester.

Abbildung 1.3.: *Fusarium*-Spezies produzieren eine große Bandbreite an Trichothecenen, wobei sich die einzelnen Toxine nur durch die unterschiedlichen Substituenten unterscheiden. Das Grundgerüst des Sesquiterpens bleibt jedoch das Gleiche. Abbildung entnommen aus Desjardins (2009).

1. Einleitung

Darunter befinden sich Polyketide wie Fumonisin (*F. verticillioides*, Gelderblom *et al.* (1988)), Gibberellinsäure (*F. fujikuroi*, (Geissman *et al.* , 1966)) oder Zearalenon (ZEA, *F. graminearum*, (Ichinoe *et al.* , 1983)). Andere toxische Verbindung aus *Fusarium spec.* gehören zu den Trichothecenen. Dies sind Sesquiterpenverbindungen, die sich durch eine C₉-C₁₀ Doppelbindung und eine C₁₂-C₁₃ Epoxidbindung auszeichnen. Die Mykotoxine, die von *F. graminearum* gebildet werden, beinhalten neben ZEA auch die Gruppe der Typ B-Trichothecene (Abb. 1.3). In dieser Gruppe wiederum sind die Trichothecene Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (NIV) sowie ihre acetylierten Derivate (3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON) und 4-Acetylnivalenol (4-ANIV)) von herausragender Bedeutung in infizierten Getreiden (Desjardins *et al.* , 1993). Die Toxizität dieser Verbindungen beruht auf einer Interaktion mit der 60S ribosomalen Untereinheit der Wirtszellen und führt damit zu einer irreversiblen Hemmung der Proteinbiosynthese und der Einleitung der Apoptose (Rocha *et al.* , 2005; Shifrin und Anderson, 1999).

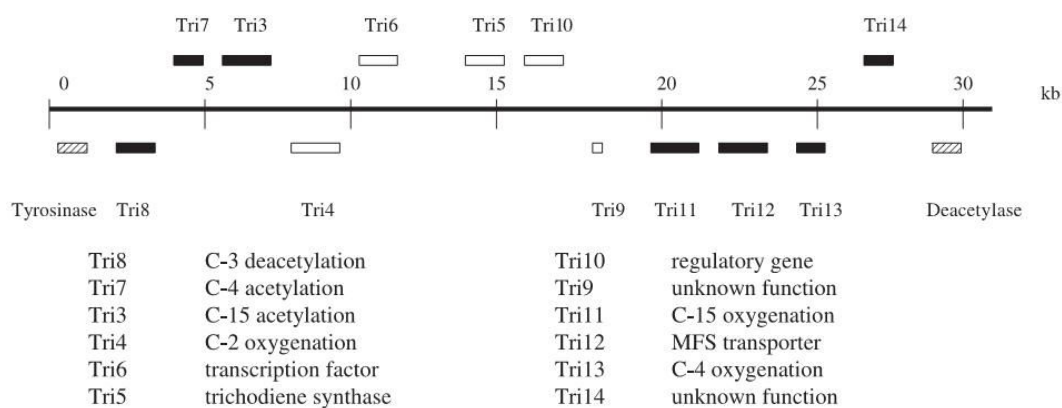


Abbildung 1.4.: Der Trichothecen-Gencluster von *F. graminearum*. Wie in vielen anderen Pilzen liegen die Gene für die Synthese eines spezifischen Sekundärmetaboliten in einer relativen räumlichen Nähe zueinander im Genom. Der Trichothecen-Gencluster in *F. graminearum* besteht aus 12 Genen, unter denen sich auch zwei Transkriptionsfaktoren befinden. Abbildung entnommen aus Goswami und Kistler (2004).

Wie bereits erwähnt und in vielen Pilzen üblich, sind auch in *F. graminearum* die Gene, welche die für die Biosynthese von Trichothecenen benötigten Enzyme kodieren ebenfalls in einem Gencluster organisiert. Sie teilen sich auf in zwei regulatorische Gene (*TRI6* und *TRI10*, neun Syntheseweg-Gene (darunter *TRI5* und *TRI4*) mit teils unbekannter Funktion und ein Transporter-Gen (*TRI12*) (Abb. 1.4). Mindestens drei weitere am *TRI*-Syntheseweg beteiligte Gene liegen außerhalb des eigentlichen Genclusters (*TRI101*, *TRI11* und *TRI16*) (Desjardins, 2009; Kimura *et al.* , 2007).

Das am besten untersuchte Enzym der Trichothecenenbiosynthese ist die Trichodiensynthase, die von dem Gen *TRI5* codiert wird. Dieses Enzym katalysiert die Zyklisierung

1. Einleitung

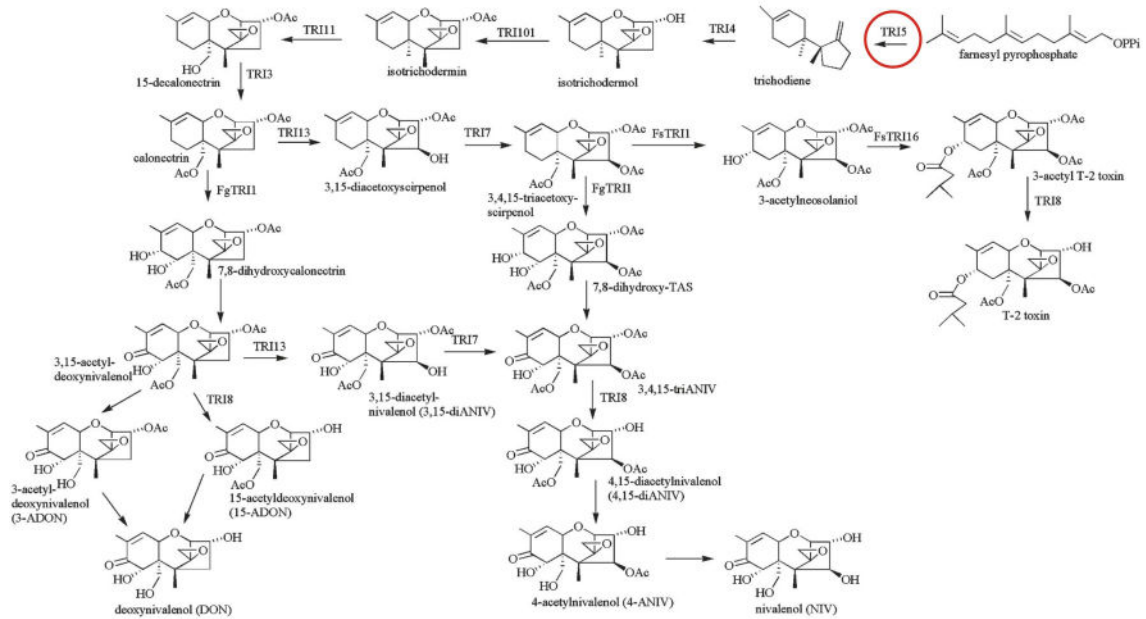


Abbildung 1.5.: Der Biosyntheseweg der Trichothecene beginnt mit der Zyklisierung von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien durch die Trichodiensynthase TRI5 (rechts oben, rot umrandet). Danach folgen weitere Zyklisierungen und Acetylierungen bis zu den endgültigen Toxinen: Deoxynivalenol, Nivalenol oder T2-Toxin. Abbildung entnommen aus Desjardins (2009)

von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien und stellt gleichzeitig das Schlüsselenzym des Syntheseweges dar. Die Deletion dieses Enzyms führt zu einem Abbruch der Trichothecenbiosynthese, da das Ausgangsprodukt Trichodien nicht mehr gebildet wird. Diese $\Delta tri5$ -Mutanten zeigten in Infektionstests auf Weizen eine sehr starke Einschränkung ihrer Virulenz. Sie waren zwar noch in der Lage das inokulierte Ährchen zu befallen, konnten sich aber nicht über die gesamte Pflanze ausbreiten. Es stellte sich heraus, dass die Pflanze die toxindefiziente Mutante durch *de novo* synthetisierte Zellwandverdickungen im Bereich des Rachisknotens in ihrem Wachstum inhibierte (Jansen *et al.*, 2005; Desjardins *et al.*, 1996; Hohn und Desjardins, 1992). Diese Ergebnisse zeigten zum Einen, dass die Fähigkeit von *F. graminearum* Trichothecene wie DON zu synthetisieren einen Virulenzfaktor auf der Pflanze darstellt. Zum Anderen weisen sie auf die besondere Bedeutung des Rachisknotens in der Pflanzenabwehr gegen ein eindringendes Pathogen hin. Der Syntheseweg der Trichothecene beginnt mit der Zyklisierung von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien durch die bereits erwähnte Trichodiensynthase (siehe Abb. 1.5). Darauf folgen weitere Zyklisierungen und Acetylierungen durch die bereits toxische Zwischenprodukte wie 3,15-Diacetoxyscirpenol oder 15-ADON entstehen. Am Ende der Synthesereihe stehen die Toxine Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV) und im Falle

1. Einleitung

des etwas anderen Syntheseweges in *Fusarium solani* das T2-Toxin. Allen Endprodukten ist jedoch das Grundgerüst des Trichothecens gemein. Obwohl alle Gene und Enzyme der Trichothecenbiosynthese, darunter auch zwei Transkriptionsfaktoren (*TRI6*, *TRI10*), bekannt sind, ist die Regulation der Toxinsynthese weiterhin weitgehend unbekannt. Die Erkenntnis, dass unterschiedliche Kohlenstoff- und Stickstoffquellen (N-Quellen) einen Einfluss auf die Produktion der Trichothecene haben, gab es bereits vor über 20 Jahren (Miller und Greenhalgh, 1985; Miller *et al.*, 1983). Diese Ergebnisse bezogen sich jedoch nur auf das Wachstum in *in vitro*-Kulturen. Die Faktoren, die für die Induktion der Trichothecenbiosynthese auf der Pflanze verantwortlich sind, waren noch unbekannt.

1.3. Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Der phytopathogene Askomyzet *F. graminearum* ist einer der bedeutendsten Schädlinge für kleinkörnige Nutzpflanzen wie Weizen, Gerste sowie für Mais. Der Befall durch dieses Phytopathogen verursacht weltweit jährlich ökonomische Schäden von insgesamt mehreren Milliarden Euro. Der Infektionsverlauf auf den Wirtspflanzen ist in den letzten Jahren sehr gut aufgeklärt worden und auf molekularer Ebene wurden die Gene identifiziert, die an der Synthese der gebildeten Mykotoxine beteiligt sind. Allerdings war über die Induktion und die Regulation dieser speziellen Sekundärmetabolite wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Induktion der Trichothecenbiosynthese durch die Generierung eines Fluoreszenzprotein-markierten Stammes zu visualisieren. Dazu sollte ein Reporterstamm kloniert werden, der zwei wichtige Fähigkeiten aufweisen soll: Zum Einen eine konstitutive Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRed, das als Marker für das Pilzwachstum sowie auch zur einfachen Lokalisierung des Myzels während des Wachstums auf der Pflanze dienen sollte. Zum Anderen sollte das grün fluoreszierende Protein GFP mit dem Promotor des Trichodiensynthase-kodierenden Gens *TRI5* fusioniert werden. Somit könnte eine Induktion der Trichothecenbiosynthese während des Infektionsverlaufs von *F. graminearum* auf der Pflanze durch fluoreszenzmikroskopische Methoden dokumentiert werden. Zusätzlich zu diesen direkten *in vivo*-Untersuchungen würde dieser Reporterstamm eine Möglichkeit bieten *in vitro* schnell und einfach nach Trichothecenbiosynthese-induzierenden Substanzen zu suchen.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und Gebrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den folgenden Firmen: Duchefa (Brüssel, Belgien), Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland), Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien), Merck (VWR International; Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland), Invitrogen (Karlstadt, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland). Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner (Frickenhäusen, Deutschland) und Macherey-Nagel (Düren, Deutschland).

2.2. Verwendete Software

Für die Planung der Klonierungsschritte und die Herstellung der Plasmidkarten wurde die Clone Manager Suite 7 von Sci Ed Central benutzt. Die Primersequenzen für die unterschiedlichen Klonierungsschritte als auch für sämtliche PCR-Reaktionen (PCR, Polymerase Ketten Reaktion) wurden mit PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>) errechnet. Die Auswertung der 96-well-plate Induktionsassays wurde mit Origin 7 (Origin-Lab Corporation) und Microsoft Excel 2007 ausgeführt. Für die Bildbearbeitung wurden die Softwaremodule CorelDRAW und Corel PHOTO-PAINT der CorelDRAW Graphics Suite X3 (Corel Corporation) verwendet.

2.3. Verwendete Organismen und Plasmide

2.3.1. *Fusarium graminearum*

In dieser Arbeit wurde der Wildtypstamm 8/1 (im Folgenden beschrieben als *Fg* 8/1 oder WT) von *F. graminearum* Schwabe (teleomorph: *Gibberella zeae* [Schwein] Petch) verwendet. Dieser Stamm wurde in Deutschland isoliert und freundlicherweise von Professor Thomas Miedaner (Landessaatzuchtanstalt, Hohenheim) zur Verfügung gestellt (Miedaner *et al.*, 2000).

2.3.2. *Escherichia coli*

Für die Klonierungsarbeiten innerhalb dieser Arbeit wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene) mit folgendem Genotyp verwendet: *recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F'*proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (tet^r)]

2.3.3. Weizen- und Maiskultivare

Die in dieser Arbeit durchgeführten Pathogenitätstest sowie fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Infektionsverlaufes von *F. graminearum* wurden auf dem suszeptiblen Weizenkultivar (*T. aestivum* L.) *Nandu* (Sommerweizen, European Wheat Data Base (EWDB¹), Accession Number RICP 01C0203421), sowie auf dem resistenten Weizenkultivar *Sumai-3* (EWDB¹, Accession Number RICP 01C0204880) durchgeführt. Für die Pathogenitätstests auf Mais wurde das Kultivar (cv.) A 188 (Maisinzuchtlinie, Maize-GDB²) verwendet.

2.3.4. Verwendete Plasmide

Folgende Plasmide kamen bei der Klonierung der Transformationsvektoren für die Herstellung des Fluoreszenzprotein-Reporterstammes zum Einsatz:

pGEM-T (Promega, Mannheim, Deutschland)

Dieses Plasmid eignet sich durch seine 3'-Thymidin-Überhänge zur direkten Klonierung von PCR-Produkten und zur anschließenden Amplifikation des PCR-Fragmentes in *E. coli*. Dieses Plasmid wurde zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten während der Generierung der Pilztransformationsvektoren genutzt.

pIGPAPA (Lee *et al.* , 2003)

Dieses Plasmid trägt das Gen für GFP, fusioniert mit dem verkürzten und damit konstitutiv aktiven Promotor des Isocitratlyasegens aus *Neurospora crassa*, sowie *hphB*, fusioniert mit dem *Aspergillus nidulans trpC*-Promotor.

pAN7-1 (Punt *et al.* , 1987)

Das Plasmid pAN7-1 wurde als Transformationsvektor für das *TRI5*Prom::GFP Konstrukt verwendet. Es wurde zur Transformation von Pilzen konstruiert und trägt das *hph*-Gen unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors aus *A. nidulans*. Eine Transformation mit diesem Vektor erlaubt die Selektion von putativen Transformanten auf Hygromycin.

¹<http://genbank.vurv.cz/ewdb/>

²<http://www.maizegdb.org/cgi-bin/displaystockrecord.cgi?id=47602>

2. Material und Methoden

pPgpd-DsRed (Mikkelsen *et al.* , 2003)

Der pPgpd-DsRed-Vektor trägt das Gen kodierend für das rot fluoreszierende DsRed-Fluoreszenz Reporterprotein unter der konstitutiven Kontrolle des *gpd1*-Promotors aus *A. nidulans*.

pII99 (Namiki *et al.* , 2001)

Der Pilztransformationsvektor pII99 trägt das Neomycin Phosphotransferase II Gen (*nptII*) unter der Kontrolle des *A. nidulans trpC* Promotors sowie Terminators. Dieser Vektor wurde verwendet, um potentielle Transformanten auf Geneticin zu selektionieren.

Während dieser Arbeit generierte Plasmide:

pTRI5::GFP (Ilgen *et al.* , 2009)

Dieser Transformationsvektor wurde für die erste Transformation von *Fg* 8/1 eingesetzt. Der Vektor trägt das Plasmidrückgrat von pAN7-1 mit dem Selektionsmarker *hph*, sowie das *TRI5*-Promotor::GFP-Fusionsfragment (Vektorkarte A.1).

pII99DsRed (Ilgen *et al.* , 2009)

Der Transformationsvektor pII99DsRed wurde für die zweite Transformation verwendet, um das rot fluoreszierende Protein DsRed in den Reporterstamm zu integrieren. Dieses Plasmid trägt die kodierende Sequenz für das DsRed-Fluoreszenz Reporterprotein. Die Antibiotikaresistenz gegen Geneticin wird durch das *nptII*-Gen gewährleistet (Vektorkarte A.2).

2.4. Medien und Kulturbedingungen

2.4.1. Anzucht von *F. graminearum*

Die Anzucht von *F. graminearum* erfolgte je nach weiterem Verwendungszweck auf Festmedium oder in Flüssigmedium. Das Festmedium wurde durch die Zugabe von Agar (1,6% Endkonzentration) zu dem Mediumansatz hergestellt. In der folgenden Aufzählung werden die Herstellung der verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung aufgelistet.

Nährmedien für *F. graminearum*:

CM-Vollmedium (complete medium)(/-Agar) nach Leach *et al.* (1982)

2 g Hefeextrakt-Mix
950 mL H₂O_{dest}
16 g Agar (Difco, optional)
10 g D-Glucose
+ 10 mL Lösung A
+ 10 mL Lösung B
+ 1 mL MNS

> Den Hefeextrakt-Mix zusammen mit dem Wasser sowie dem Agar autoklavieren und abkühlen lassen. Lsg. A und B auf 50 mL auffüllen, die Glucose darin lösen und in das Medium sterilfiltrieren. Die Spurenelement-Lösung (MNS) unter sterilen Bedingungen dazu pipettieren.

MM-Minimalmedium (minimal medium)(/-Agar) nach Leach *et al.* (1982)

Zusammensetzung wie CM-Medium, allerdings ohne den Hefeextrakt-Mix.

Lösung A (100x)

10% Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O

Lösung B (100x) (sterilfiltriert)

2% KH₂PO₄
2,5% MgSO₄ x 7 H₂O
1% NaCl

Hefeextrakt-Mix

1 g Hefeextrakt
0,5 g Casein, säurehydrolysiert
0,5 g Casein, enzymatisch hydrolysiert

> Die einzelnen Bestandteile des Hefeextrakt-Mixes können auch im selben Verhältnis vorgemischt werden.

2. Material und Methoden

MNS-Lösung

60 mg H_3BO_3
390 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
13 mg KI
60 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
51 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$
5,5 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,93 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
2 mL Chloroform (gut durchmischen, zum Sterilisieren)
ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

SNA-(*Synthetic Nutrient Poor*)-Medium nach Nirenberg (1981)

1 g KH_2PO_4
1 g KNO_3
0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
0,5 g KCl
0,2 g D-Glucose
0,2 g Saccharose
(16 g Agar)
ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Glucose/Yeast-Extract/Peptone-Medium (GYEP)

50 g Glucose
1 g Hefeextrakt
1 g Pepton
ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{dest}$
> autoklavieren, **WICHTIG**: nur für 20 min autoklavieren!

In den Induktionsassays wurden zusätzlich zu den oben genannten Medien noch die Fertigmedien „Rice Extract Agar“, „Starch Agar“ und „Malt Extract Agar“ der Firma Difco verwendet.

2.4.2. Gewinnung von *F. graminearum*-Konidien

Für die Gewinnung von Konidien wurden SNA-Agarplatten mit Konidien oder mit einem Stück Myzel in der Mitte angeimpft. Die Agarplatten wurden anschließend bei 18°C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 16 h Hell- und 8 h Dunkelphase (sichtbares Licht und langwelliges UV) etwa 1,5 bis 2 Wochen inkubiert. Die Konidien wurden mit jeweils 4 mL eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ von der Platte gespült und durch ein 100 μm Wilson-Sieb gefiltert. Anschließend wurde die Konidienzahl in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Konzentration der Konidien wurde je nach Verwendungszweck eingestellt (20-100 Konidien/ μL) und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.4.3. Anzucht von *F. graminearum* auf unterschiedlichen Stickstoffquellen

Die Anzucht von *F. graminearum* mit verschiedenen Stickstoffquellen erfolgte in flüssigem Medium bzw. auf Agarplatten. Dabei wurde bei der Herstellung von Komplettmedium (CM) und Minimalmedium (MM) auf die Zugabe der Lösung A (CaNO_3) verzichtet und die Stickstoffquellen nach Fertigstellung zugegeben. Hier muss erwähnt werden, dass der Hefeextrakt-Mix in CM neben dem zugegebenen Stickstoff auch eine Stickstoffquelle für das wachsende Myzel darstellt. Die so modifizierten Medien wurden mit $\text{CM}_{mod.}$ und $\text{MM}_{mod.}$ bezeichnet. Um eine mögliche Beteiligung der pilzlichen Glutamin-Synthetase an der Regulation des Stoffwechsels nachzuweisen, wurde dieses Enzym spezifisch mit MSX (L-Methionin-DL-Sulfoximin, Sigma-Aldrich) gehemmt. Dazu wurde, ebenso wie für die Stickstoffquellen, eine Stocklösung angesetzt und das entsprechende Volumen für die gewünschte Endkonzentration direkt zum Medium gegeben.

Getestete Stickstoffquellen:

Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Stocklösung 500 mM

Ammoniumnitrat, NH_4NO_3 , Stocklösung 500 mM

Ammoniumchlorid, NH_4Cl , Stocklösung 500 mM

Glutamin, Stocklösung 500 mM

> Die Lösungen wurden in jeweils 5 mL $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Da Glutamin mit der Zeit instabil wird, wurde diese Lösung immer frisch für das jeweilige Experiment angesetzt.

Für die Herstellung der Agarplatten wurden die entsprechenden Medien frisch autoklaviert und in einem Wasserbad auf 60°C temperiert, um den Agar flüssig zu halten. Für die Agarplatten wurden 50 mL Agar in ein 50 mL Röhrchen steril abgefüllt und die für die entsprechende Konzentration benötigte Menge der Stocklösung hinzugefügt. Nach 30maligem Invertieren des Röhrchens wurde das Medium auf zwei Agarplatten aufgeteilt (je 25 mL). Nach Erkalten des Agars wurden die Platten mit 10 μL einer Konidien suspension (100 Konidien/ μL , insg. 1000 Konidien) in der Mitte der Platte angeimpft, mit einem Streifen Parafilm verschlossen und bei 28°C und Dunkelheit inkubiert. Für die Versuche in Flüssigmedium wurden 50 mL GYEP-Medium in kleinen Erlenmeyerkolben (250 mL) mit 5000 Konidien angeimpft und für 3 Tage bei 28°C auf einem Schütteltisch bei 150 Upm inkubiert, um eine Vorkultur zu erhalten. Das gewachsene Myzel wurde anschließend in sterile 50 mL Röhrchen überführt und 15 min bei 5000 Upm in der Laborzentrifuge (Heraeus) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Myzel mit 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ gewaschen. Das Myzel wurde wieder abzentrifugiert und der Prozess zweimal wiederholt.

2. Material und Methoden

Das gewaschene Myzel wurde in neuen Erlenmeyerkolben in 50 mL flüssigem MM_{mod} aufgenommen und die jeweilige Stickstoffquelle bis zur gewünschten Endkonzentration zugegeben. Die Kulturen wurden wieder bei 28°C im Dunkeln auf einem Schütteltisch (150 Upm) inkubiert.

2.4.4. Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht der Zellen erfolgte in flüssig LB-Medium oder auf LB-Agarplatten. Zur Amplifikation der transformierten Zellen wurde eine Kolonie einer bewachsenen LB-Agarplatte mittels eines sterilen Zahnstochers gepickt und in etwa 50 mL LB-Medium mit den jeweiligen Selektionsantibiotika überführt. Nach 24 h bei 37°C und 200 Upm auf dem Schüttler konnten die Zellen geerntet und für die Plasmidisolation (siehe 2.5.1, Seite 16) verwendet werden.

Nährmedien für *E. coli* (LB-Medium):

- 25 g LB-Broth High Salt, (Duchefa)
- (15-20 g Agar (Difco), 1,5-2%)
- > autoklavieren und abkühlen lassen
- > Zugabe von Antibiotika zur Plasmidselektion:
 - 1 mL Ampicillin (100 mg/mL, sterilfiltriert) = Amp100; Endkonzentration: 100 µg/mL
 - oder
 - 1 mL Kanamycin (30 mg/mL, sterilfiltriert) = Kan30; Endkonz.: 30 µg/mL
- ad 1 L H_2O_{dest}

2.4.5. Anzucht der Weizen- und Maiskultivare

Die Anzucht der Weizen- und Maiskultivare erfolgte im Gewächshaus bzw. für die Weizenkultivare teilweise in einer Klimakammer. Dazu wurden die einzelnen Körner in kleinen Anzuchtschalen bis zu einem Alter von etwa 2 Wochen in Anzucherde angezogen. Die Weizenpflanzen wurden daraufhin zu Fünft in größere Pflanztöpfe umgesetzt und bis zum Zeitpunkt der Anthese weiterhin im Gewächshaus oder in der Klimakammer gehalten. Zum Zeitpunkt der Anthese wurden die Weizenpflanzen in die Infektionskammern transferiert, damit hier die Inokulation unter kontrollierten Bedingungen stattfinden konnte. Die Maispflanzen wurden jeweils einzeln in größere Pflanztöpfe umgesetzt und im Gewächshaus weiter angezogen.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Isolation von bakterieller Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989). Hierbei wurden die Zellen aufgebrochen und anschließend durch eine schnelle Absenkung des pHs die unter diesen Bedingungen einzelsträngig vorliegende DNA zu einem komplexen Netz verbunden und ausgefällt. Die in ihrer „supercoiled“-Form vorliegenden Plasmide sind davon nicht betroffen und bleiben in Lösung. Proteine und RNA werden ebenfalls durch den Einsatz von SDS und Kaliumacetat unlöslich und zusammen mit der denaturierten genomischen DNA (gDNA) ausgefällt und entfernt. Zur eigentlichen Isolierung wurden von den angezogenen Kulturen jeweils 1,5 mL in einem 2 mL Reaktionsgefäß für 15 sek bei 13.000 Upm (MiniSpin[®], Eppendorf) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 200 μ L GTE durch vortexen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 400 μ L NaOH/SDS und vorsichtiges Invertieren aufgebrochen. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis und Zugabe von 200 μ L K-Acetat und 5 μ L RNase wurde das Gemisch für weitere 30 min auf Eis inkubiert, danach bei 13.000 Upm 3 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 480 μ L eiskaltem Isopropanol und eine Inkubation von 5-10 min auf Eis wurde die Plasmid-DNA gefällt und anschließend 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Die gefällte DNA wurde vom Überstand befreit, mit 400 μ L Ethanol (80%, eiskalt) gewaschen und nochmals für 1 min zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde die Plasmid-DNA getrocknet (Trockenschrank, 60°C) und je nach Größe des erhaltenen Niederschlages in 20-50 μ L TE resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Auf den folgenden Seiten werden die benötigten Lösungen aufgelistet.

Lösungen für die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen:

GTE

50 mM Glucose
10 mM Na-EDTA
25 mM Tris-HCl, pH 8,0

Kaliumacetat-Lösung

60 mL 5 M Kaliumacetat Stammlösung
11,5 mL Essigsäure
28,5 mL H₂O

2. Material und Methoden

SDS/NaOH-Lösung

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA

RNase

10 mg/mL RNase, Stammlösung

Um eine eventuelle Kontamination der RNase Stammlösung durch DNasen auszuschließen, wurde die Lösung für eine Stunde bei 90°C denaturiert. Ebenso wurden GTE und TE autoklaviert, um Kontaminationen vorzubeugen. Die RNase wurde bei -20°C, alle anderen Lösungen bei RT aufbewahrt.

2.5.2. Isolation pilzlicher genomischer DNA nach der CTAB-Methode

Zur Isolation von pilzlicher genomischer DNA wurde 25 mL Komplettmedium mit Konidien angeimpft und die Kultur im Dunkeln bei 28°C auf dem Schütteltisch (150 Upm) inkubiert. Nach 3 - 4 Tagen wurde die gesamte Kultur über einen Büchnertrichter in einen Whatmanfilter abfiltriert und mehrmals mit H₂O_{dest} gewaschen. Zum Trocknen wurde das abfiltrierte Myzel mit einem frischen Papierfilter abgedeckt und anschließend zwischen mehreren Lagen saugfähigem Papier ausgedrückt. Das frische Myzel wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und etwa 100 mg des Myzelpulvers wurden in 900 µL CTAB-Lysispuffer in 2 mL Reaktionsgefäßen resuspendiert. Restliches gemörsertes Myzel wurde bei -70°C für eine spätere Verarbeitung gelagert. Um die Zellen aufzubrechen, wurden die Reaktionsgefäße in einem auf 65°C vorgeheizten Heizblock für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Puffer bei 13.000 Upm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Um Proteine auszufällen, wurde 900 µL Chloroform zugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig 10 Mal unter dem Abzug invertiert. Nach einem weiteren 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 Upm wurde die obere Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und 750 µL Isopropanol zugegeben. Nach vorsichtigem 25-maligem Invertieren wurde die DNA für 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die gefällte DNA für 30 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig (!) entfernt und der Niederschlag mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen (nicht Vortexen oder Mischen!). Nach weiteren 5 min Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde der Überstand entfernt und die

2. Material und Methoden

DNA kurz getrocknet. Sollte die DNA während der Trocknung zu trocken werden besteht die Gefahr, dass sie sich später nicht mehr vollständig löst. Um eine vollständige Lösung des DNA-Pellets zu gewährleisten wurde es in 450 μL TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 55°C in einem Thermoschüttler gelöst. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei 4°C.

CTAB-Lysispuffer

14,45 mL $\text{H}_2\text{O}_{dest}$
2,5 mL 1 M Tris-HCL pH 8,0
7 mL 5 M NaCl
1 mL 0,5 M EDTA (Ethyldiamintetraacetat), pH 8,0
0,5 g CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)

2.5.3. Isolierung von RNA aus pilzlichem und pflanzlichem Material

Für die RNA-Isolierung aus den Minikulturen der 96-Lochplatten wurde das Myzel mit einer Pinzette unter leichtem Drehen aus den einzelnen Vertiefungen geerntet und in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereint. Um möglichst wenig Flüssigkeit in dem geernteten Myzel zu verschleppen, wurden die abgeernteten Kulturen 15 min bei 5.000 Upm in der Heraeus Laborzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur späteren Aufarbeitung wurde das 15 mL Röhrchen anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Für die RNA-Isolierung aus pflanzlichem Material wurden die mit dem Reporterstamm infizierten Pflanzenteile isoliert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die eigentliche Isolierung von RNA aus pilzlichem sowie aus pflanzlichem Gewebe erfolgte mit dem NucleoSpin[®] RNA II Kit bzw. dem NucleoSpin[®] RNA Plant Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben.

2.5.4. DNA-Restriktion

Bei einer Restriktion schneiden Restriktionsendonukleasen doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Die einzelnen Fragmente dieser Restriktion können dann in einer Gelelektrophorese (siehe 2.5.8) nach ihrer Größe getrennt und bei Bedarf aus dem Gel eluiert werden. Erst diese Enzyme ermöglichen die gezielte Klonierung neuer DNA-Konstrukte und wurden für die Herstellung der Transformationsvektoren verwendet. Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben verwendet (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

2.5.5. Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten fand während einer PCR unter Standardbedingungen statt. In der nachfolgenden Auflistung ist ein allgemeiner PCR-Ansatz gezeigt. Eine Auflistung aller während dieser Arbeit verwendeten Primer mit Angabe ihrer Sequenz findet sich im Anhang in Tabelle A.1.

Standard PCR-Ansatz, 25 μL :

2,5 μL Puffer
1 μL 10 mM dNTP-Mix
0,625 μL 10 mM Sense-Primer
0,625 μL 10mM Antisense-Primer
1 μL Template DNA
0,1 μL Taq-Polymerase (5 Units/ μL)
ad 25 μL $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

2.5.6. Fusions-PCR

Für die Klonierung des *TRI5*-Promotor-GFP-Fusionskonstruktes wurden zuerst in unabhängigen PCRs der *TRI5*-Promotor mit den Primern TRI5Prom-fwd und TRI5Prom-rev aus genomischer DNA, sowie die GFP-Sequenz mit den Primern TRI5-GFP-fwd und GFPHindIII-rev aus dem Plasmid pIGPAPA amplifiziert. Mit diesen Primern wurden zum einen ein homologe Sequenz zu *TRI5* sowie eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII* in das GFP-PCR-Fragment eingeführt. Die beiden Fragmente wurden dann in einer Fusions-PCR mit den Primern TRI5Prom-fwd und GFPHindIII-rev miteinander fusioniert (Primersequenzen siehe Anhang, S. 146). Die Fusions-PCR wurde durchgeführt nach Jansen *et al.* (2005); Amberg *et al.* (1995).

Fusions-PCR-Mix

jeweils 5 μL Template (2+5 μL)
2 μL Puffer (10x)
2,5 μL dNTP-Mix (2 mM)
0,25 μL Taq-Polymerase (5U/ μL , „proofreading“)
2 μL MgCl_2 , wenn nicht schon im Puffer integriert
ad 25 μL H_2O

Fusions-PCR-Programm

Schritt 1: 94°C, 4 min
Schritt 2: 94°C, 1 min
Schritt 3: 55 - 60°C, (Gradient) 1 min
Schritt 4: 72°C, 1 min pro 1 kb Produktlänge

2. Material und Methoden

35 Zyklen von Schritt 2 bis 4

Schritt 5: 72 °C 10 min

Das PCR-Produkt auf einem Agarosegel auftrennen. Es sollte ein „Schmier“ zu erkennen sein, mit einer distinguierten Bande in der Größe des erwarteten Fusionsproduktes.

2.5.7. Reverse Transkription und semiquantitative PCR

Die reverse Transkription von RNA zu cDNA wurde mit dem „Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden bis zu 10 μ L Volumen aus der RNA-Präparation direkt in die cDNA-Synthese eingesetzt. Nach erfolgter reverser Transkription wurde der cDNA-Ansatz in der Regel 1:10 verdünnt und dann in der semiquantitativen PCR eingesetzt. Zuvor wurde eine Standard-PCR mit Primern für ein Referenzgen (*β -Tubulin*) in unterschiedlichen Zyklen gefahren um die lineare Phase der Amplifikation abschätzen zu können (siehe Abb. 2.1). Anschließend wurde mit einem gleichen Volumen aus den unterschiedlichen cDNA-Ansätzen bei der ermittelten PCR-Zyklenzahl eine PCR gefahren und die Produkte auf einem Agarosegel aufgetragen. Die Stärke der Banden wurde mit der Bildanalysesoftware ImageJ³ ermittelt und die Volumen des eingesetzten cDNA-Ansatzes so berechnet, dass gleiche Mengen cDNA in der PCR eingesetzt wurden. Anschließend wurden mit demselben Volumeneinsatz die semiquantitativen PCRs für die untersuchten Gene durchgeführt und die Produkte auf einem Agarosegel aufgetragen.

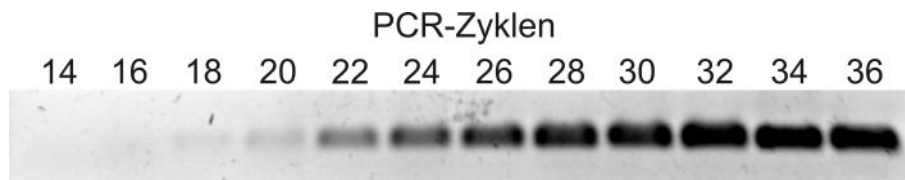


Abbildung 2.1.: PCR-Produkt von *β -Tubulin* nach unterschiedlich vielen PCR-Zyklen. Aus der PCR-Reaktion wurde ein gleiches Volumen auf das Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die lineare Phase der PCR-Produkt Amplifikation liegt etwa zwischen 22 und 26 PCR-Zyklen.

2.5.8. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten

Die restringierte Plasmid- oder genomische DNA bzw. das PCR-Produkt wurde zur Analyse in einem Agarosegel unter Einfluss eines elektrischen Feldes nach der Fragmentgröße aufgetrennt. Das Gelmaterial besteht aus in TBE-Puffer aufgekochter und anschließend im Gelschlitten erstarrter Agarose (1%). Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Spannung

³<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

2. Material und Methoden

(ca. 100 V) in horizontalen Gelapparaturen in einfach konzentriertem TBE-Puffer. Vor dem Beladen des Gels wurden die DNA-Proben mit 6-fachem Loading-Dye (Gel-Ladepuffer) (Fermentas) versetzt. Als Größenstandard wurde der 1 kb DNA-Ladder GeneRuler (Fermentas) benutzt. Nach ausreichender Auftrennung, die Trennungszeit variierte nach Gel und Beladung, wurde das Gel für etwa 15-20 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) angefärbt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht, wodurch die DNA-Banden im Agarosegel auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und fotografiert werden können.

Agarosegel-Laufpuffer, TBE 10x

108 g Tris
55 g Borsäure
40 mL 0,5 M EDTA, pH 9,0
ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

2.5.9. Transformation von *E. coli* durch "Heat Shock"

Ein Aliquot der chemischkompetenten *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, anschließend mit 0,5 - 1 μg Plasmid-DNA oder dem gesamten Ligationsansatz bzw. dem PCR-Produkt auf Eis gemischt und 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und mit 800 μL vorgewärmtem LB-Medium versetzt. Nach einer Stunde bei 37°C wurden die Zellen auf zuvor angewärmten Selektionsagarplatten (LB + jeweiliges Antibiotikum, meist: Ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ausgestrichen und weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

2.5.10. Transformation von *F. graminearum*

Für die Protoplasten vermittelte Transformation von *F. graminearum* wurde zunächst eine Vorkultur angezogen. Dazu wurde 30.000 Konidien des WTs *Fg* 8/1 in 50 mL Komplettmedium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben bei 28°C und 150 Upm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die komplette Kultur, zusammen mit 150 mL frischem Komplettmedium, in einem Waringblender dreimal für je 10 Sekunden gemixt. Von diesem Myzel wurden 50 mL mit 150 mL frischem Komplettmedium gemischt und in einem 500 mL Erlenmeyerkolben über Nacht bei 24°C und 150 Upm kultiviert. Am folgenden Tag wurde der Enzym-Mix angesetzt und die Pilzkultur durch ein 100 μm Wilson-Sieb filtriert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{MilliQ}$ wurde das Myzel auf einem Stapel sterilem Whatman-Filterpapier getrocknet und das Gewicht des Myzels in einem sterilen und gegengewogenen 50 mL Röhrchen bestimmt. Der angesetzte Enzym-Mix sollte für die

2. Material und Methoden

Protoplastierung von 1-1,5 g Myzel ausreichend sein. Das gewogene Myzel wurde mit dem Enzym-Mix für 2-3 h in einem 100 mL Erlenmeyerkolben bei 28°C und 75 Upm inkubiert. Nach 2 h wurde die Protoplastierung unter dem Mikroskop begutachtet, um die Inkubationszeit eventuell zu verlängern. Die Protoplastierung ist fertig, wenn das meiste Myzel als Protoplasten vorliegt. *Von nun an ist es wichtig nur auf Eis zu arbeiten und alle Lösungen auf Eis vorzukühlen!* Die Protoplasten werden erst durch ein 100 μm und anschließend durch ein 40 μm Wilson-Sieb filtriert und bei jedem Filtrationsschritt mit 10 mL eiskaltem Natrium-Phosphat-Puffer gewaschen. Die filtrierten Protoplasten wurden in einem 15 mL Röhrchen mit rundem Boden für 10 min bei 2200 Upm und 4°C abzentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Der Protoplasten-Niederschlag wurde vorsichtig in einem kleinen Volumen Natrium-Phosphat-Puffer resuspendiert und das Röhrchen komplett mit frischem Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde er bei 2000 Upm, 2°C, für 10 min zentrifugiert und das Pellet, wie bereits beschrieben, wieder in neuem Puffer aufgenommen. Um die Konzentration an Protoplasten zu bestimmen, wurde eine Probe gezogen und die Menge an Protoplasten in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Transformation wird ein Minimum von 1×10^7 Protoplasten benötigt. Dazu wurden der Protoplasten-Niederschlag in eiskalter STC-Lösung zu einem finalen Volumen von 1 mL aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden etwa 25 μg des linearisierten Transformationsvektors gegeben und *sehr* vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min leicht gemischt. Anschließend wurde 1 mL vorgekühltes PTC zu dem Ansatz gegeben, wieder vorsichtig gemischt und weitere 15 min unter gelegentlichem Mischen (alle 2 min) auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 8 mL eiskaltes STC zugegeben und durch Invertieren mit dem Transformationsansatz gemischt. Die transformierten Protoplasten wurden anschließend in 750 μL Aliquots auf Regenerationsplatten ausplattiert. Dabei war darauf zu achten die Protoplasten sehr vorsichtig auszuplattieren um ein Platzen zu verhindern. Die Transformationsplatten wurden über Nacht bei 28°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Overlay-Agar angemischt. Die absolute Menge richtet sich nach der Anzahl der Transformationsplatten, wobei jede Platte mit 10 mL Overlay-Agar überschichtet wurde. Diese Platten wurden wiederum bei 28°C inkubiert und jeden Tag auf Transformanten untersucht. Auf den folgenden Seiten werden die benötigten Lösungen aufgelistet.

2. Material und Methoden

Benötigte Lösungen und Medien:

STC

1,2 M Sorbitol
10 mM Tris-HCl, pH 7,0
50 mM CaCl₂
ad 100 mL H₂O_{MilliQ}
> autoklavieren

PTC

60% PEG 4000 (Polyethylenglycol)
10 mM Tris-HCl, pH 7,0
50 mM CaCl₂
ad 50 mL H₂O_{MilliQ}
> autoklavieren

700 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 5,6

40,9 g NaCl
8,6 mL NaH₂PO₄ (500 mM)
1,4 mL Na₂HPO₄ (500 mM)
ad 1 L H₂O_{MilliQ}
> auf pH 5,6 einstellen

Enzym-Mix

5% Driselase (Sigma)
3,5% Glucanex (Novo)
in 20 mL 700 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 5,6) lösen
vortexen und bei RT in einem 50 mL Röhrchen bei 5000 Upm für 15 min zentrifugieren
Überstand anschließend sterilfiltrieren
20 mL des Enzym-Mixes sollten für 1-1,5 g Myzel ausreichen

Regenerationsmedium

2 g Hefe-Caseinmix für Regenerationsmedium
1 g Hefeextrakt, 1 g enzymatisch hydrolysiertes Casein
342 g Saccharose
16 g Agar (granuliert, Difco)
ad 1 L H₂O_{MilliQ}
> autoklavieren
> pro 96 mm Petrischale 10 mL Regenerationsmedium

2. Material und Methoden

Overlay-Agar

- 1,2% Agar (granuliert, Difco), in H_2O_{MilliQ}
- > autoklavieren und auf „Handwärme“ abkühlen lassen vor der Zugabe von:
 - 200 μg Hygromycin oder
 - 200 μg Geneticin
- pro mL Overlay-Agar
- > 10 mL pro Transformationsplatte

Selektionsplatten

- 1,6% Agar in Kompletmedium, siehe 2.4.1, S. 12
- > autoklavieren und auf „Handwärme“ abkühlen lassen vor der Zugabe von:
 - 100 μg Hygromycin oder
 - 100 μg Geneticin
- pro mL Medium

2.5.11. Selektion und Vereinzelung von putativen Transformanten

Einzelne Kolonien, die sich nach der Überschichtung mit Selektionsagar (siehe Abschn. 2.5.10) nach ein paar Tagen an der Oberfläche der Agarplatte zeigten, wurden gepickt, auf eine neue Platte Selektionsagar überführt und weiter bei 28°C inkubiert. Auf diesen Platten entwickelten sich schnell Konidien, die mit etwa 200 μL sterilem Wasser abgenommen wurden. Je nach der Menge der Konidien wurde ein Teil dieser Konidien suspension *sehr dünn* auf einer neuen Agarplatte Selektionsmedium ausplattiert und für 4 - 6 h keimen lassen. Unter dem Binokular wurden einzelne keimende Konidien vorsichtig mit einem Skalpell abpräpariert und auf neuen Selektionsplatten vereinzelt. Die vereinzelt putativen Mutanten wurden nach diesem Schritt in Flüssigmedium angezogen um genomische DNA zu isolieren und die Integration des Transformationsvektors mittels eines Southern Blottes bestimmen zu können (zur Anzucht der Kulturen und DNA-Isolierung siehe 2.5.2).

2.5.12. Southern-Blot-Analyse

Für die weitergehende Analyse der genomischen Integration der Transformationsvektoren wurden von einigen der gepickten Transformanten Southern-Blots erstellt. Dabei wurde die isolierte genomische DNA (siehe 2.5.2) mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, um ein möglichst charakteristisches Bandenmuster in der späteren Detektion zu erlangen und dadurch Rückschlüsse auf das Integrationsereignis ziehen zu können. Im Folgenden werden die einzelnen Reagenzien und Schritte der Southern-Blot-Analyse im Detail beschrieben.

2. Material und Methoden

DNA-Verdau und Gelelektrophorese:

Um eine eindeutige Detektion der gesuchten Banden zu gewährleisten, werden pro Spur etwa 2 μg gDNA benötigt. Die entsprechende Menge wurde in einem Gesamtvolumen von 500 μL über Nacht mit 20 Units Restriktionsenzym verdaut. Am nächsten Tag wurde der Verdau überprüft, indem 20 μL der Restriktion auf ein TBE-Gel aufgetragen wurden. Der Rest der verdauten gDNA wurde mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 0,7 Volumen eiskaltem Isopropanol für 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde der Fällungsansatz für 30 min bei 4°C und 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 μL TE-Puffer aufgenommen. Der Verdau wurde auf ein 0,8%iges TBE-Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Laufzeit des Gels, je nach erwarteter Größe der Fragmente, variierte. Zusätzlich zu der gDNA der Transformanten wurde die gDNA des WTs und 0,1 - 0,2 ng des linearisierten Transformationsvektors als Kontrollen aufgetragen. Als Größenstandard kam ein Digoxigenin-markierter DNA-Standard der Firma Roche zum Einsatz (Dig-Marker VII bzw. III). Abschließend wurde das Gel für 5 - 10 min in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und mit einer Geldokumentationsanlage fotografisch festgehalten. Um auf dem späteren Southern-Blot die jeweiligen Banden besser zuordnen zu können, wurde ein Lineal neben das Gel gelegt, dessen Nullpunkt auf Höhe der Geltaschen lag.

Um ein Binden der markierten Sonden an die jeweiligen DNA-Sequenzen zu ermöglichen, müssen vor dem eigentlichen Blot noch Strangbrüche eingeführt und eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA gewährleistet werden. Dies wird durch aufeinanderfolgende, 10-minütige Bäder in Nickingpuffer, Denaturierungspuffer und abschließend in Neutralisierungspuffer erreicht.

Der Kapillartransfer:

Für den Transfer der DNA vom Agarosegel auf die Membran werden folgende Materialien benötigt:

500 mL 20x SSC Transferlösung

250 mL 2x SSC

1 Hybond NX- Nylon Membran (Amersham), so groß wie das Gel. Vorsicht!: Die Membran *nur* an den Ecken und *nur* mit Handschuhen und/oder Pinzetten anfassen

4 Stücke Whatman-Filterpapier so groß wie das Gel

1 Whatman-Filterpapier-Brücke (2 - 3 mal länger als das Gel)

Ein schematischer Aufbau des Southern-Blots ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Dabei handelt

2. Material und Methoden

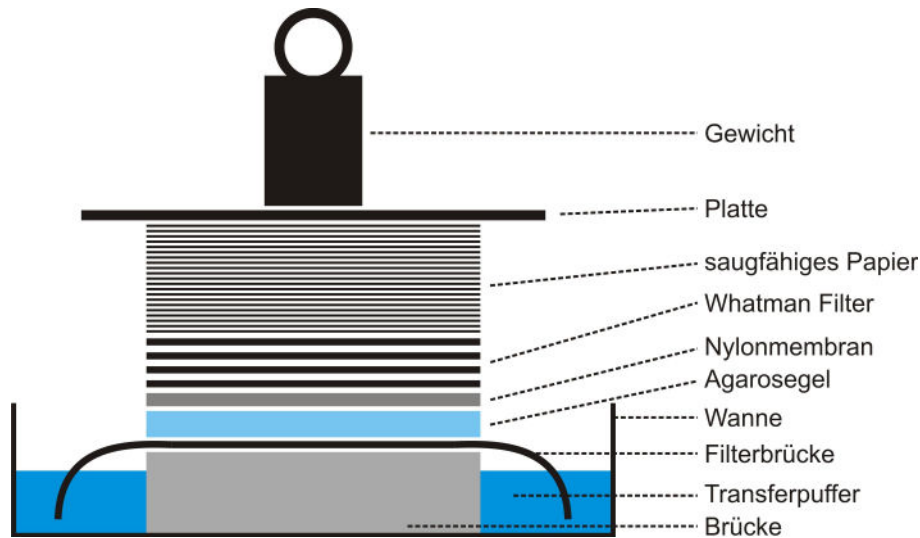


Abbildung 2.2.: Schematische Abbildung des Aufbaus des Southern-Blots. Während der Durchführung dieser Arbeit wurde das „Upward blotting“ durchgeführt, bei dem der Transferpuffer durch die Saugwirkung der Kapillarkräfte nach oben durch das Gel und die Nylonmembran gezogen wird.

es sich um das sogenannte „Upward blotting“, den Fluss des Transferpuffer nach Oben beschreibend. Für den Transfer der DNA auf die Membran wurde eine Plastikwanne mit etwa 500 mL 20x SSC gefüllt und eine Platte als Brücke darübergerlegt. Auf diese Platte wurde die zuvor in 20x SSC getränkte Filterpapierbrücke gelegt, so dass die längeren Enden in den Transferpuffer hingen. Auf diese Filterpapierbrücke wurde das Gel gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich zwischen dem Gel und dem Filterpapier keine Luftblasen befanden. Auf das Gel wurde die in 2x SSC getränkte Nylonmembran gelegt. Zuvor sollte die DNA-Seite der Membran mit einem Bleistift markiert werden, um später die Orientierung beizubehalten. Hier wurde wieder darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Um eine möglichst gleichmäßige Saugwirkung zu gewährleisten, folgten auf die Membran die in 2x SSC angefeuchteten Filterpapiere und ein Stapel Zellstoff (Papierhandtücher). Um einen gleichmäßigen Druck auf den Blot auszuüben, wurde eine weitere Platte mittig auf den Papierstapel gelegt und mit einer vollen 500 mL Flasche beschwert. Da es durch überhängendes Papier zu einem „Kurzschluss“ des Pufferflusses kommen kann, wurden die überhängenden Enden der Filterpapierbrücke mit Aluminiumfolie abgedeckt. Der Blot wurde über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurden der Papierstapel vorsichtig entfernt und die Nylonmembran kurz in 2x SSC gewaschen. Um die transferierte DNA auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde die nasse Membran in einem UV-Crosslinker (Stratagene) mit UV-Licht bestrahlt. Während dieser Zeit darf die Membran nicht trockenfallen, da es sonst bei der späteren

2. Material und Methoden

Detektion zu einem starken Hintergrund kommen kann. Nach der kovalenten Bindung der DNA an die Membran kann diese in einem Plastikbeutel eingefroren und so längere Zeit gelagert werden. Der Transfer wurde überprüft, indem das Agarosegel nochmals mit Ethidiumbromid gefärbt wurde. Die DNA-Banden sollten deutlich schwächer sein als vor dem Transfer auf die Membran. Auf den folgenden Seiten werden die benötigten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Southern-Blot-Blottingpuffer:

TBE 10x (1 L)

108 g Tris
55 g Borsäure
40 mL 0,5 M EDTA, pH 9,0
ad 1 L H₂O_{dest}

Verwendete Stocklösungen

5 M NaOH
1 M Tris-HCl, pH 7,5
1 M Tris-HCl, pH 9,5
20% SDS (100 mL), *unter Abzug abwiegen!*
10% N-Lauryl-Sarcosin (100 mL), *unter Abzug abwiegen!*

Blocking-Lösung (50 mL)

Blocking-Reagenz (Roche) in 1x B1 Lösung

Nickingpuffer (1 L)

0,25 N HCl

Denaturierungspuffer (1 L)

1,5 M HCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer (1 L)

0,5 M Tris-HCl, pH 7,5
1,5 M NaCl

20x SSC (1 L)

175,2 g NaCl
88,2 g Na-Citrat
ad 1 L H₂O_{dest}

2. Material und Methoden

5x B1 (1 L)

58,05 g Maleinsäure

43,83 g NaCl

ad 1 L H₂O_{dest}

Die ganze Zeit unter dem Abzug arbeiten, Handschuhe und Schutzbrille tragen! Die Chemikalien nach und nach in 700 mL H₂O_{dest} einrühren, ebenso nach und nach 35 g Natriumhydroxid einrühren und pH 7,5 mit 10 N NaOH einstellen.

B2 (250 mL)

1x B1

1% Blocking-Reagenz

B3 (250 mL)

100 mM Tris-HCl, pH 9,5

100 mM NaCl

DIG-Markierung der DNA-Sonden:

Die Detektion des Integrationsereignisses erfolgt durch die Anlagerung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden während der Hybridisierung der Membran. Dazu mussten die Sonden für die jeweiligen Konstrukte erst hergestellt werden. Dies erfolgte in einer standardisierten PCR bei der ein Teil der Nukleotide durch DIG-markiertes dUTP ersetzt wurde. An dieser Stelle muss der Hinweis gegeben werden, dass nicht jede DNA-Polymerase für die Verwendung mit DIG-markiertem dUTP geeignet ist. Daher ist es ratsam, die Herstellerangaben zu beachten sowie die PCR vor dem Herstellen der eigentlichen Sonde zu testen. Um Rückschlüsse auf die Qualität der Markierung schließen zu können, wurde die gleiche PCR ohne DIG-markiertes dUTP durchgeführt. Aufgrund der Größe des Digoxigenins sollte eine gut markierte Sonde auf einem Testgel deutlich höher laufen als das Produkt der Kontroll-PCR.

Allgemeiner PCR-Ansatz für die DIG-Markierung

10 - 100 pg Template

2,5 μ L PCR-Puffer (10x)

0,75 μ L MgCl₂ (50 mM)(falls nicht schon im Puffer enthalten)

0,5 μ L dNTP-Mix (10 mM)

1,5 μ L DIG-dUTP

1 μ L Forward-Primer (100 pmol/ μ L)

1 μ L Reverse-Primer (100 pmol/ μ L)

0,5 μ L Taq-Polymerase (1U/ μ L)

ad 25 μ L H₂O_{dest}

2. Material und Methoden

Nach der PCR wurde der gesamte 25 μ L PCR-Ansatz mit 20 mL Prähybridisierungspuffer gemischt und für die Hybridisierung verwendet. Der Hybridisierungspuffer kann mehrfach verwendet werden, wenn er zwischen den einzelnen Hybridisierungen bei -20°C gelagert wird.

Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion:

Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Membran mit der DNA-Seite nach Innen zu liegen kam. Vor der Prähybridisierung wurde die Membran nochmals mit 2x SSC für 2 min auf einem Rolltisch oder in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurde das SSC abgegossen und durch 20 mL Prähybridisierungspuffer ersetzt. In diesem Puffer musste die Membran 2-5 h bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert werden. Kurz vor Ende der Inkubation wurde der Hybridisierungspuffer in einem Wasserkocher für 10 min aufgekocht und anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt. Der Prähybridisierungspuffer wurde durch 10 mL Hybridisierungspuffer ersetzt und die Hybridisierung bei 68°C im Hybridisierungssofen über Nacht ausgeführt. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und die Membran zweimal mit 50 mL W1 Waschpuffer für 5 min bei RT auf dem Rolltisch gewaschen. Während dieser Zeit wurde der Waschpuffer 2 auf die Hybridisierungstemperatur gebracht. W1 wurde mit W2 getauscht und die Membran für 2x 15 min bei 68°C inkubiert. Nach diesem Waschschrift kann direkt mit der Detektion fortgefahren werden oder die Membran bei -20°C gelagert werden. Alle für die Detektion notwendigen Schritte werden bei RT in einem Hybridisierungsröhrchen durchgeführt. Zuerst wurde die Membran mit W3 kurz gewaschen und dann in 10-15 mL Blocking-Lösung für 30-60 min inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Blocking-Lösung verworfen und durch 10-15 mL Antikörperlösung ersetzt. Dieser Mix wurde für 30 min inkubiert, danach die Antikörperlösung verworfen und die Membran mit 50 mL W3 dreimal für jeweils 20 min gewaschen. Im Anschluss wurde die Nylonmembran 5 min in 10-15 mL B3 inkubiert. Auf eine Plastikfolie wurden 500 μ L CSPD aufgebracht und die Membran mit der DNA-Seite in die Lösung gelegt. Die Membran wurde mit einer zweiten Plastikfolie bedeckt, Luftblasen ausgestrichen und für 5 min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf eine neue Plastikfolie transferiert, eingeschweißt und bei 37°C für 15 min inkubiert, um die Lumineszenzreaktion zu verstärken. Für die Detektion wurde die Membran mit der DNA-Seite auf einen Röntgenfilm gelegt und 30 min in einer Filmkassette exponiert. Im Anschluß wurde der Film entwickelt. Falls der Film unter- oder überbelichtet ist, die Belichtungszeit entsprechend verlängern oder verkürzen. Der fertig entwickelte Film wurde zur Dokumentation eingescannt. Im Folgenden werden

2. Material und Methoden

die benötigten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Southern-Blot-Detektionspuffer:

Prähybridisierungspuffer (50 mL)

5x SSC
0,1% N-Lauryl-Sarcosin
0,2% SDS
2% Blocking-Reagenz

Hybridisierungspuffer (20 mL)

Prähybridisierungspuffer + DIG-markierte Sonde

B1 (250 mL)

1x B1

Waschpuffer 1 (W1)(1 L)

2x SSC
0,1% SDS

Waschpuffer 2 (W2)(1 L)

0,2x SSC
0,1% SDS

Waschpuffer 3 (W3)(1 L)

1x B1
0,3% Tween 20

Antikörperlösung (50 mL)

Anti-Digoxigenin Antikörper, 1:10000 verdünnt in B2

CSPD-Lösung

Chemilumineszenz-Reagenz CSPD, 1:100 verdünnt in B3

2.6. Infektionsversuche von Weizenpflanzen (*T. aestivum* L.)

Die Inokulation der unterschiedlichen Weizenkultivare fand kurz nach der Anthese statt. Dabei wurden 10 μL einer wässrigen Konidiensuspension (20 Konidien/ μL) mit einer 10 μL Eppendorf-Pipette in das blühende Ährchen injiziert. Pro Ähre wurden zwei Ährchen inokuliert, wobei darauf geachtet wurde zwei gegenüberliegende Blüten zu infizieren. Um in den ersten Tagen der Kolonisierung eine ausreichende Feuchtigkeit zu gewährleisten, wurden die inokulierten Ähren mit befeuchteten Plastiktüten abgedeckt, die nach drei Tagen wieder entfernt wurden. Der Verlauf der Infektion wurde jeden Tag verfolgt, wobei zu unterschiedlichen Zeitpunkten infizierte Ähren geerntet wurden und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden.

2.7. Infektionsversuche von Maispflanzen (*Z. mays* L.)

Vor der Infektion von Maiskolben mit einer Konidiensuspension von *F. graminearum* mussten die Kolben bestäubt werden. Dazu wurden die Tasseln (Antheren, männliche Blütenorgane) abgeschnitten und die Pollen in einer gefalteten Papiertüte aufgefangen. Anschließend wurde der gesammelte Pollen auf die Narbenfäden aufgebracht und leicht in die Fäden einmassiert, um eine möglichst vollständige Bestäubung zu gewährleisten. Nach der Pollinierung wurden die bestäubten Blüten mit der Papiertüte abgedeckt. Die Infektion mit *F. graminearum* erfolgte drei Tage nach der Pollinierung durch eine Injektion von 4 mL einer Konidiensuspension (4×10^4 Konidien/mL) mit einer Spritze und aufgesetzter Kanüle direkt in den Griffelkanal. Zur Kontrolle wurden Kolben mit dem gleichen Volumen an $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ inokuliert. Die infizierten Kolben wurden analog zu dem Vorgehen an Weizen mit einer angefeuchteten Plastiktüte abgedeckt, die nach drei Tagen wieder entfernt wurde. Die Infektion war nach 5 Wochen beendet und die infizierten Kolben wurden abgeerntet.

2.8. Screening auf *TRI5*-induktive Substanzen

Das Screening auf Trichothecenbiosynthese induzierende Substanzen wurde in schwarzen 96-Lochplatten (flacher Boden, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ausgeführt. Die Beladung der 96-Lochplatten erfolgte mit unterschiedlichen Flüssig- als auch Festmedien, wobei die zu testenden Substanzen auf unterschiedliche Weise in das Medium gegeben wurden. Im Falle der mit Agar verfestigten Medien wurde das noch flüssige Medium in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und in einem Heizblock unter der Sterilbank

2. Material und Methoden

konstant auf 50°C gehalten. In dem noch flüssigen Medium wurde dann die jeweilige Konzentration der zu testenden Substanz eingestellt, indem das entsprechende Volumen aus einer Stocklösung in den Agar pipettiert wurde. Das Reaktionsgefäß wurde dann sofort verschlossen und auf einem Vortexer dreimal für je fünf Sekunden gemischt. Danach wurden jeweils 100 μL des Mediums direkt in die Kavitäten pipettiert und unter der Sterilbank erkalten lassen. Dabei wurde darauf geachtet, keine Luftblasen im Agar zu erzeugen. Im Falle der Flüssigmedien wurde analog verfahren, allerdings war hier die Temperierung nicht notwendig. Diese Methode wurde für die zu testenden, alkoholischen Extrakte aus Weizen- und Maiskörnern (siehe Abschn. 2.9.3) dahingehend abgewandelt, dass das jeweilige Volumen für die entsprechende Endkonzentration der Extrakte im Medium zuerst in die Kavitäten vorgelegt wurde. Das Lösungsmittel wurde dann in der Speedvac (Christ, Alpha RVC) oder unter dem konstanten Luftstrom der Sterilbank vollständig abgedampft und danach erst mit 100 μL Flüssigmedium aufgefüllt.

Tabelle 2.1.: Getestete Substanzen: Die aufgelisteten Substanzen wurden in den Induktionsassays auf ihre *TRI5*-induktiven Eigenschaften untersucht.

Verwendete Testsubstanzen		
Phenylpropanoidsäuren	Salze	ROS-Induktoren
Ferulasäure	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	H_2O_2
<i>p</i> -Cumarinsäure	NH_4Cl	Menadion
Phenyllessigsäure	NH_4NO_3	
Quercetin	NaCl	
Transchlorogensäure		
Vanillinsäure		
Zimtsäure		
4-Hydroxybenzoesäure		
2,3-Dihydroxybenzoesäure		
3,4-Dihydroxybenzoesäure		
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure		
3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure		

Die Inokulation der Kavitäten erfolgte mit 10 μL einer Konidiensuspension (20 Konidien/ μL) des GFP-Reporterstammes oder des WTs in die Mitte der einzelnen Kavität (im Folgenden auch Minikultur genannt). In der Regel wurden jeweils 16 Kavitäten (2x8) mit dem selben Medium-Testsubstanz-Gemisch bzw. mit purem Medium als Kontrolle angeimpft. Die Platten wurden dann in einer angefeuchteten Plastiktüte bei 28°C im Dunkeln inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Fluoreszenzen von DsRed und GFP in einem

2. Material und Methoden

Fluoreszenzspektrometer (Fluoroskan Ascent, Thermo Scientific) gemessen. Zusätzlich wurden die Platten auch unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht, um genauere Informationen über das Wachstum und die Qualität der Fluoreszenz der Kulturen zu erhalten. In Tabelle 2.1 sind alle Substanzen aufgelistet, die in diesen Induktionsassays verwendet und getestet wurden. Dabei wurden immer Stammlösungen angesetzt und aus diesen die Endkonzentration im Medium eingestellt. Diese Minikulturen dienten auch für die Extraktion von RNA aus induzierten und nicht-induzierten Kulturen. Dazu wurden die Minikulturen der einzelnen Kavitäten mit einer Pinzette unter leichtem Drehen entnommen und das Myzel in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Das restliche Medium wurde ebenfalls in einem 15 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Sowohl Mediumüberstand als auch Myzel wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Für die Extraktion von RNA aus diesen Kulturen siehe Abschn. 2.5.3 auf S. 18.

2.8.1. Messung des DON-Gehaltes

Die Messung des Gehaltes an DON in Medienüberständen aus Flüssigkulturen oder in infizierten Pflanzenteilen erfolgte mit dem ELISA-Test (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) RIDASCREEN[®] DON der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland). Der Test wurde nach Herstellerangaben verwendet. Da die Mengen bei der Bestimmung des DON-Gehaltes in Feststoffproben (Mehl, etc.) nicht immer nach Angaben (5 g Feststoff auf 25 mL H_2O) eingehalten werden konnten, wurde versucht das Verhältnis von Probe (Gewicht) zu Lösungsvolumen beizubehalten. So wurden zum Beispiel 100 mg getrocknete und gemahlene Rachisknoten in $250\ \mu\text{L}\ \text{H}_2\text{O}_{dest}$ aufgeschlämmt, abzentrifugiert und der Überstand den Herstellerangaben entsprechend im eigentlichen Test eingesetzt. Erwähnenswert ist jedoch, dass Verdünnungen angefertigt werden sollten, damit die Messwerte der Proben möglichst in der Mitte der Eichwerte liegen.

2.9. Isolierung von Extrakten aus pflanzlichen Geweben

2.9.1. Aufarbeitung und Isolierung von Extrakten aus infizierten Weizenähren

Über einen Zeitraum von mehreren Wochen wurden Weizenähren jeweils zum Zeitpunkt der Anthese mit *Fg* 8/1 oder mit Wasser als Kontrolle inokuliert. Fünf Tage nach Infektion wurden die Ähren abgeerntet und die infizierten Teile herauspräpariert. Das herauspräparierte Rachiselement enthielt einen Teil der Rachis und den Rachisknoten. Das befallene Ährchen mit den Hüllblättern und der Karyopse wurde entfernt. Die Teile wurden gesammelt und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Auf diese Weise konnte genug Material für eine Extraktion gewonnen werden. Vor der Extraktion wurden die Rachiselemente in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser von Hand zu einem feinen Pulver vermahlen. Abbildung 2.3 zeigt ein Flußdiagramm, das die aufeinanderfolgenden Extraktionsschritte vereinfacht darstellt. Die erste Extraktion erfolgte mit 10 mL H_2O /1 g Gewebe für 15 min in einem Ultraschallbad bei 45°C . Die Suspension wurde abfiltriert und der Überstand bis zur Trockene in einem Rotationsverdampfer abrotiert. Die Rohextrakte wurden danach wieder in H_2O aufgenommen. Das restliche Material der Rachiselemente wurde anschließend analog zu der ersten Extraktion mit Ethanol (EtOH) extrahiert. Jedoch wurde hier die Extraktion dreimal durchgeführt und die Überstände jeweils vereint. Auch hier erfolgte die Trocknung der Extrakte in einem Rotationsverdampfer, die Aufnahme der Extrakte erfolgte wieder mit EtOH. Um den Wasserextrakt weiter aufzutrennen, wurde dieser nacheinander noch mit Cyclohexan (CH), Chloroform (Chl.) und Essigsäureethylester (EE) ausgeschüttelt und diese vorfraktionierten Extrakte wieder bis zur Trockenheit abrotiert. Diese Extrakte wurden in Acetonitril gelöst.

2.9.2. HPLC/MS-Analyse

Für die Analyse und die Bestimmung der Molekulargewichte der unterschiedlichen Extrakte wurde eine HPLC/MS (HP-LC/MSD System Series 1100, Hewlett Packard, Waldbronn) verwendet. Während des Laufes wurden die Massenspektren mit positiver und negativer Polarität, mit „Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“, aufgezeichnet. Die Kapillarspannung bei positiven Ionen betrug 3500 V und der Coronastrom $4 \mu\text{A}$, bei negativen Ionen wurde eine Kapillarspannung von 2200 V und ein Coronastrom von $12 \mu\text{A}$ angelegt. Die Temperatur der Verdampfungskammer betrug 400°C . Zur Auftrennung der Extrakte wurde eine RP18-Säule (Superspher 100, RP18, 125x2 mm, $4 \mu\text{m}$, Merck, Darmstadt)

2. Material und Methoden

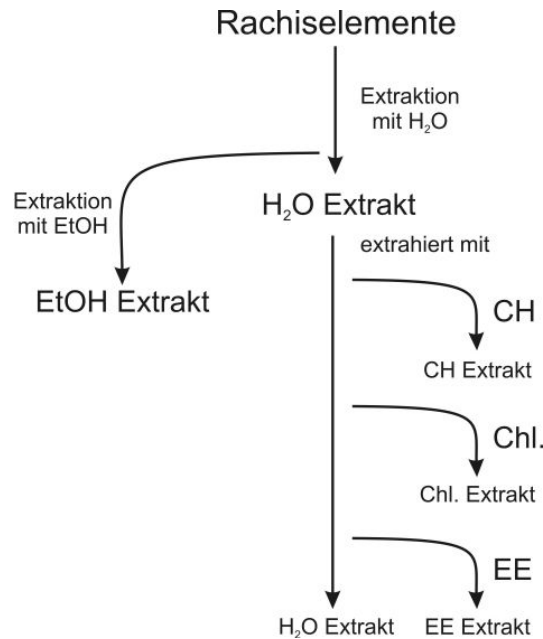


Abbildung 2.3.: Fluiddiagramm der Gewinnung von Extrakten aus Weizenähren. Das Gewebe aus infizierten und nicht infizierten Weizenähren wurde dem gezeigten Schema gemäß aufbereitet und die unterschiedlichen gewonnenen Extrakte zur Analyse in die HPLC gegeben.

verwendet. Als Eluent kam mit 0,1% HCOOH angesäuertes H₂O_{dest} zum Einsatz. In einem HPLC/MS-Lauf wurden zwischen 0,1 μ L und 10 μ L der Probe mit einer Konzentration von 5 mg/mL injiziert. Die Analysen wurden bei 40°C Säulenofentemperatur durchgeführt. Für die Chromatographie wurde Acetonitril als Lösungsmittelgradient verwendet. Dazu wurde die Konzentration von 1% innerhalb von 10 min auf 100% Acetonitril erhöht und zwischen Minute 12 und 13 des Laufs wieder auf 1% herabgesetzt. Die Flussrate des Lösungsmittels betrug 0,45 mL/min.

2.9.3. Aufarbeitung und Isolierung von Substanzen aus Weizen- und Maiskörnern

Die Aufarbeitung und Isolierung alkohollöslicher Substanzen erfolgte sowohl für Weizen- als auch für Maiskörner nach dem gleichen Schema. Es wurden Weizenkörner des Sommerweizens „Munk“ (Ernte 2004, Saatgut Lochow Petkus) sowie Popcorn-Maiskörner ("Nature Garden“, Kluth GmbH & Co.KG, Henstedt-Ulzburg) verwendet. Die Körner wurden vor der Extraktion in einer Mühle möglichst fein gemahlen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Mühle zwischen den einzelnen Mahlvorgängen abkühlen konnte. Das gemahlene Weizen- bzw. Maismehl wurde in Blaukappenflaschen abgefüllt und dunkel,

2. Material und Methoden

kühl und trocken gelagert. Für die Extraktion wurden jeweils 5 g Mehl mit dem 10fachen Volumen (50 mL) Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion erfolgte bei 60°C für 15 min im Wasserbad unter gelegentlichem Aufschütteln (alle 5 min). Nach einem Extraktionszyklus wurde der Überstand in zwei 50 mL Falcon-Röhren überführt und für 10 min bei 4500 Upm in der Heraeus Minifuge abzentrifugiert, während die nächste Extraktion erfolgte. Insgesamt wurde die Extraktion dreimal durchgeführt, so dass ein Gesamtvolumen von 150 mL Extrakt zustande kam. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände durch einen Faltenfilter (150 mm, Schleicher u. Schuell) direkt in einen gegengewogenen Glaskolben abfiltriert. Der gewonnene Extrakt wurde in einem Wasserbad bei 60°C unter Vakuum bis zur Trockenheit in einem Rotationsverdampfer abrotiert. Nach erfolgter Trocknung wurde der Kolben wieder gewogen und das Extrakt in einer Konzentration von 50 mg/mL aufgenommen. Die so gewonnenen Extrakte wurden in HPLC-Probengläschen gefüllt und bei 4°C gelagert.

2.9.4. Definierte Isolierung von Speicherproteinen aus Weizen und Mais

Die Isolierung der unterschiedlichen Speicherproteinen erfolgte nach Zörb *et al.* (2010). Dabei werden die Globuline/Albumine, Gliadine und Glutenine nacheinander aus einer Probe extrahiert. Die so gewonnenen Extrakte können direkt weiterverwendet werden. In Vorbereitung für die Extraktionen wurde Weizen und Mais in einer Getreidemühle der Firma Schnitzer (Grano 200) zu feinem Mehl vermahlen und trocken sowie lichtgeschützt aufbewahrt. Im Folgenden werden die einzelnen Extraktionsschritte weiter beschrieben.

Isolierung der Globulin/Albumin-Fraktion: Für die Extraktion der Speicherproteine wurden jeweils 200 mg Mehl in einem 2 mL Reaktionsgefäß eingewogen, mit 1 mL Extraktionspuffer 1 gemischt und für 2 min gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 13.000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge (MiniSpin®) für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion ein weiteres Mal, wie beschrieben, durchgeführt. Die Überstände wurden vereint.

Isolierung der Gliadin-Fraktion: Der Niederschlag aus der Globulin/Albumin-Extraktion wurde in 800 μ L Extraktionspuffer 2 resuspendiert, ebenfalls für 2 min gevortext und bei 13.000 Upm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und, wie bereits beschrieben, die Extraktion wiederholt. Auch hier wurden die Überstände vereint.

Isolierung der Glutenine: Bevor die Glutenine extrahiert werden konnten, musste

2. Material und Methoden

der Niederschlag aus der vorhergehenden Extraktion mit 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ gewaschen werden, um das Ethanol zu entfernen. Danach wurde dieser in 800 μL Extraktionspuffer 3 resuspendiert und bei 60°C in einem Eppendorf Thermomixer für 10 min geschüttelt. Die Extraktion wurde wieder bei 13.000 Upm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Extraktionspuffer 1

70 mM Na_2HPO_4
70 mM KH_2PO_4
0,4 M NaCl, pH 7,6

Extraktionspuffer 2

60% Ethanol

Extraktionspuffer 3

50% Isopropanol
2 M Harnstoff
1% Dithiothreitol (DTT)
0,5 M Tris-HCl, pH 7,5

2.9.5. SDS-PAGE

In einer SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide-Gelelektrophorese) werden Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt, ähnlich wie bei der Agarosegelelektrophorese DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wird. Da Proteine jedoch oftmals eine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur aufweisen, muss diese vor und während der Auftrennung aufgebrochen werden. Durch Zugabe des anionischen Tensids Natrium Dodecylsulfat (SDS) werden diese Strukturen aufgehoben und zusätzlich wird die Eigenladung des Proteins, bedingt durch die jeweilige Aminosäurezusammensetzung, maskiert. Dies führt zu einer gleichmäßig negativen Ladung der isolierten Proteine, wodurch sie sich innerhalb eines elektrischen Feldes leicht auftrennen lassen.

Bevor die Gele gegossen werden können, müssen die Gelapparatur, die Glasscheiben, Abstandhalter und Kämme mit 70% Ethanol gereinigt und dann mit fusselfreien Tüchern getrocknet werden. Für das Trenngel werden alle Komponenten bis auf das TEMED zusammengegeben und in einem Becherglas gut gemischt. Zum Starten der Polymerisation wird das TEMED zugegeben, kurz gemischt und die Reaktionslösung sofort in die vorbereitete Gelapparatur gegossen. Das Gel wird mit 100% Isopropanol überschichtet, um eine gerade und gleichmäßige Geloberseite zu gewährleisten. Nach etwa einer halben

2. Material und Methoden

Stunde sollte die Polymerisation abgeschlossen sein und das Sammelgel kann gegossen werden. Dazu wird das Isopropanol abgegossen und Reste mit einem Stück Filterpapier oder fusselfreiem Zellstoff abgetupft. Die Herstellung des Sammelgels erfolgt analog zu der des Trenngels. In das noch flüssige Sammelgel wird der Gelkamm gesteckt und das Gel kann für etwa 30 min auspolymerisieren. Nach dem Erstarren des Gels wird die Gelapparatur in die passende Wanne gestellt und die Kammern mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Um Luftblasen in den Geltaschen zu vermeiden, sollte der Kamm erst gezogen werden, wenn die Kammern bereits mit Laufpuffer geflutet sind.

SDS-PAGE Laufpuffer, 10x

0,25 M Tris
1,92 M Glycin
1% SDS [w/v]
> vor der Elektrophorese muss der Laufpuffer noch 1:10 verdünnt werden

Zusammensetzung des Trenngels, 12% Acrylamid, 10 mL Volumen

3,3 mL H₂O_{dest}
4 mL Polyacrylamid-Mix (19:1 Acrylamid-Bisacrylamid)
2,5 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,15 mL 10% SDS
0,15 mL 10% APS
0,006 mL TEMED

Zusammensetzung des Sammelgels, 5% Acrylamid, 5 mL Volumen

3,4 mL H₂O_{dest}
0,83 mL Polyacrylamid-Mix (19:1 Acrylamid-Bisacrylamid)
0,63 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8
0,05 mL 10% SDS
0,05 mL 10% APS
0,005 mL TEMED

Vor dem Beladen des Gels werden die Proteinproben 1:1 mit Proteinladepuffer versetzt und auf 95°C erhitzt. Durch die Hitze und das im Ladepuffer vorhandene β -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken aufgebrochen und eine vollkommene Denaturierung der Proteine sichergestellt. Die Proteinproben, die mit alkoholischen Lösungen gewonnen wurden, müssen etwas länger (3-5 min) und mit offenem Deckel auf 95°C erhitzt werden um den überschüssigen Alkohol zu verdampfen, der beim Beladen des Gels hinderlich wäre. Zusätzlich zu den Proteinproben wird ein Proteinmarker (siehe Anhang, Abb. A.3) aufgetragen, um die Masse der Proteine im fertigen Gel abschätzen zu können.

2. Material und Methoden

Proteinladepuffer 2x

10% Glycerol
2,3% SDS
5% β -Mercaptoethanol
0,25% [w/v] Bromphenol Blau
63 mM Tris-HCl, pH 6,8

Die SDS-PAGE wird für etwa drei bis vier h, abhängig wie schnell die Lauffront das Ende des Gels erreicht, bei 100 V durchgeführt. Nach Abschluss wird die Gelapparatur auseinandergelassen und das Gel vorsichtig aus dem beiden Glasplatten genommen. Das Sammelgel wird abgetrennt und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen wird für mindestens drei h in der Coomassiefärbelösung unter leichtem Schwenken gefärbt. Um das überschüssige Coomassie anschließend wegzuwaschen, wird das Gel in der Entfärbelösung belassen, bis die angefärbten Proteinbanden klar hervortreten. Ein eventueller blauer Hintergrund kann gemildert werden, indem das Gel nochmals einige Zeit in Wasser gespült wird. Das fertig gefärbte Gel kann in eine Plastikfolie eingeschweißt und zur Dokumentation auf einem Scanner digitalisiert werden.

Coomassiefärbelösung und Entfärbelösung

Färbelösung:

1 g Coomassie 'Brilliant Blue G250'
250 mL Isopropanol
100 mL Essigsäure
750 mL H_2O_{dest}

Entfärbelösung:

10% Essigsäure

2.10. Fluoreszenzmikroskopie

Der Verlauf der Infektion und die Induktion der Trichothecenbiosynthese während des Wachstums des Reporterstammes auf der Pflanze wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt und aufgezeichnet. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation die infizierten Pflanzen geerntet und Gewebeschnitte präpariert, die dann unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Die Gewebeschnitte wurden hauptsächlich von Hand präpariert, indem mit einer neuen Rasierklinge (Wilkinson) möglichst dünne Schnitte von dem Pflanzengewebe abpräpariert wurden. Diese Schnitte wurden sofort auf einem Objektträger mit Wasser benetzt und für die anschließende Mikroskopie mit einem Deckglas fixiert. Die Präparierung von Rachislängsschnitten wurde ebenfalls von

2. Material und Methoden

Hand sowie mit einem Mikrotom (HYRAX V 50, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Für die Dokumentation der Fluoreszenzbilder wurden zwei Fluoreszenzmikroskope verwendet. Zum Einen das Stereo-Fluoreszenzmikroskop MZ FL III (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit der Farbkamera Leica DFC 500. Die Softwareverarbeitung der Bilddaten erfolgte mit der Leica Application Suite (Version 2.7.1). Des Weiteren wurde das Fluoreszenzmikroskop AxioImager.Z1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) ausgestattet mit einem ApoTome und der Fluoreszenzlampe HXP 120 verwendet. Zur Verwendung kamen die folgenden Objektive: EC Plan NEOFLUAR 10x/0,3Ph1, 20x/0,5Ph2, 40x/0,75 und Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Öl. Die Dokumentation der Fluoreszenzbilder erfolgte mit der Kamera AxioCam MRm und der AxioVision Software (Zeiss, Version 8.4.1). Die verwendeten Filtersätze, die in den genannten Mikroskopen verbaut sind, sind in Tabelle 2.2 mit ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen angegeben.

Tabelle 2.2.: Fluoreszenzfilter der verwendeten Mikroskope

Verwendete Fluoreszenzfilter				
	Bezeichnung	Anregung (nm)	Strahlteiler	Emission (nm)
Leica MZ FLIII:	GFP Plus	480/40		510 LP
	GFP Plant	470/40		525/50 BP
	DsRed	546/12		560 LP
Zeiss AxioImager.Z1:	DAPI	335-383	395	420-470
	DsRed	538-562	570	570-640
	GFP	450-490	495	500-550

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung und Verifizierung des GFP-Reporterstammes

Das Ziel der Klonierung des GFP-Reporterstammes war es die Induktion der Trichothecenbiosynthese in *F. graminearum* während des Wachstums in Kultur und in pflanzlichem Gewebe zu verfolgen und nachzuvollziehen. Um dies zu ermöglichen, wurde der Promotor des initialen Gens (*TRI5*) des Trichothecen-Syntheseweges mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. Als zusätzliches Charakteristikum wurde das rot fluoreszierende Protein DsRed, unter der konstitutiven Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Promotors (*gpdA*) aus *A. nidulans*, in das Genom integriert. Dadurch ist es möglich, sowohl pilzliches Wachstum als auch die Induktion der Toxinbiosynthese gleichzeitig, aber unabhängig voneinander zu detektieren. Um Lokalisierungseffekte im Genom auszuschließen und eine natürliche Regulation des *TRI5*-Promotor-GFP-Fusionskonstruktes zu gewährleisten, sollte die Integration direkt innerhalb des *TRI5*-Genclusters erfolgen. Somit sollte der resultierende Reporterstamm folgende Charakteristika aufweisen: 1. einen funktionalen *TRI5*-Lokus; 2. eine *TRI5*-Promotor regulierte Transkription von GFP und 3. eine konstitutive Expression von DsRed.

Die ersten beiden Bedingungen wurden durch die Transformation des WTs mit dem Plasmid pTRI5::GFP erfüllt. Ein 1095 bp großes Fragment des *TRI5*-Genlokus wurde mit den Primern TRI5Prom-fwd (bindet 945 bp „upstream“ des *TRI5*-Startcodons) und TRI5Prom-rev (bindet 150 bp „downstream“ des *TRI5*-Startcodons) in einer PCR amplifiziert. Dieses PCR-Fragment beinhaltet nahezu die komplette Sequenz „upstream“ des *TRI5*-Startcodons und sollte den kompletten *TRI5*-Promotor enthalten, sowie 150 Basenpaare (bp) der *TRI5*-kodierenden Sequenz. Die GFP-Sequenz wurde mit den Primern TRI5-GFP-fwd und GFPHindIII-rev aus dem Plasmid pIGPAPA amplifiziert. Zusätzlich wurde durch den Primer GFPHindIII-rev eine *HindIII*-Restriktionsstelle eingeführt um die spätere Klonierung zu erleichtern. Das *TRI5*-Fragment und das GFP-PCR-Produkt wurden in einer Fusions-PCR (siehe 2.5.6) mit den Primern TRI5Prom-fwd und GFPHindIII-rev kombiniert und anschließend in den pGEM-T-Klonierungsvektor ligiert. Das *TRI5*-Promotor::GFP Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *ScaI* aus pGEM-T isoliert und in den mit *HindIII* und *EheI* geöffneten Vektor pAN7-1 ligiert.

3. Ergebnisse

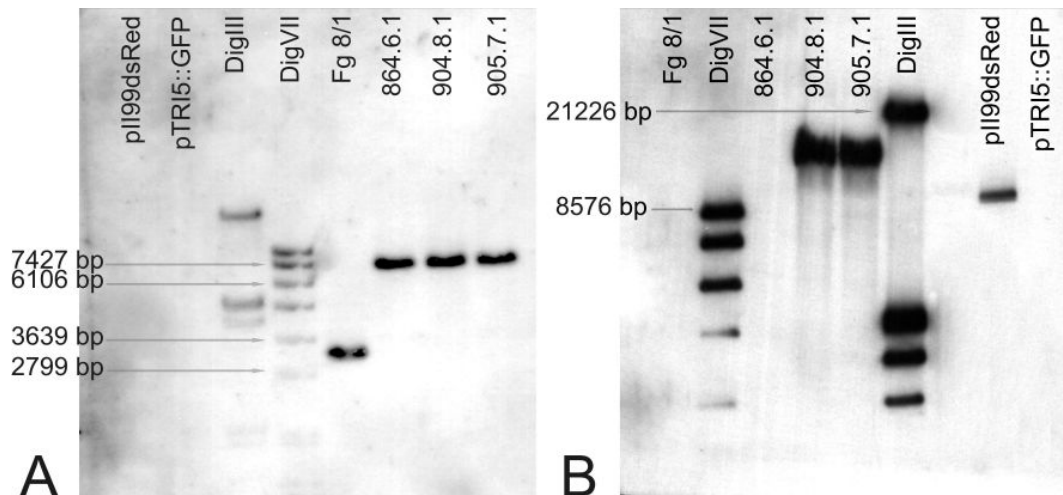


Abbildung 3.1.: Southern-Blot-Analyse ausgewählter Transformanten nach der Integration des DsRed-tragenden Plasmids pII99DsRed. **A** Hybridisierung mit einer *TRI5*-Sonde, die innerhalb der *TRI5*-kodierenden Sequenz bindet. Zur Kontrolle wurde auch Plasmid-DNA von pII99DsRed und pTRI5::GFP aufgetragen, um eventuelle Kreuzhybridisierungen ausschließen zu können. Für den WT (*Fg* 8/1) wurde eine Bande bei 3083 bp erwartet. Eine Verschiebung dieser Bande auf 7008 bp zeigt die Integration von pTRI5::GFP in den *TRI5*-Locus. **B** Hybridisierung mit der DsRed-Sonde. Weder der WT noch die Primärtransformante 864.6.1 zeigen eine Hybridisierung mit dieser Sonde. Für die Integration des 9042 bp großen pII99DsRed in das Rückgrat des bereits vorhandenen pTRI5::GFP wurde eine 10 kb Bande erwartet. Sowohl die Sekundärtransformante 904.8.1 als auch 905.7.1 zeigten diese Bande. Für die weiteren Versuche wurde die Transformante 905.7.1 ausgewählt. Als DNA-Marker wurden die Digoxigenin-markierten Marker DigIII und DigVII (Roche) verwendet. In **A** sind die 2799 bp, 3639 bp, 6106 bp und 7427 bp Banden von DigVII markiert. In **B** sind die Banden der Größe 8576 bp von DigVII und die 21226 bp Bande von DigIII markiert. *Abbildung entnommen aus Ilgen et al. (2009).*

Dieser Vektor trägt eine Hygromycin-Resistenzkassette bestehend aus dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen unter der Kontrolle des *gpdA*-Promotors. Der finale Vektor wurde pTRI5::GFP genannt (Abb. 3.2). Vor der Transformation wurde der Vektor mit *Acc65I* innerhalb der Promotorsequenz linearisiert und dann per homologer Rekombination in das Genom des *F. graminearum*-Isolates *Fg* 8/1 über Protoplasten-vermittelte Transformation integriert (Maier *et al.*, 2006). Nach der Transformation wurden einige Hygromycin-resistenten Transformanten auf die Integration des Plasmids in einem Southern-Blot überprüft. Die gDNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco81I* und *CpoI* restringiert. Zur Hybridisierung wurde eine DIG-markierte *TRI5*-Sonde verwendet, die innerhalb der *TRI5*-Gensequenz bindet. Eine erfolgreiche Integration in den *TRI5*-Locus sollte eine Verschiebung der Wildtypbande von 3083 bp zu 7008 bp bewirken (siehe Abb. 3.1 A).

3. Ergebnisse

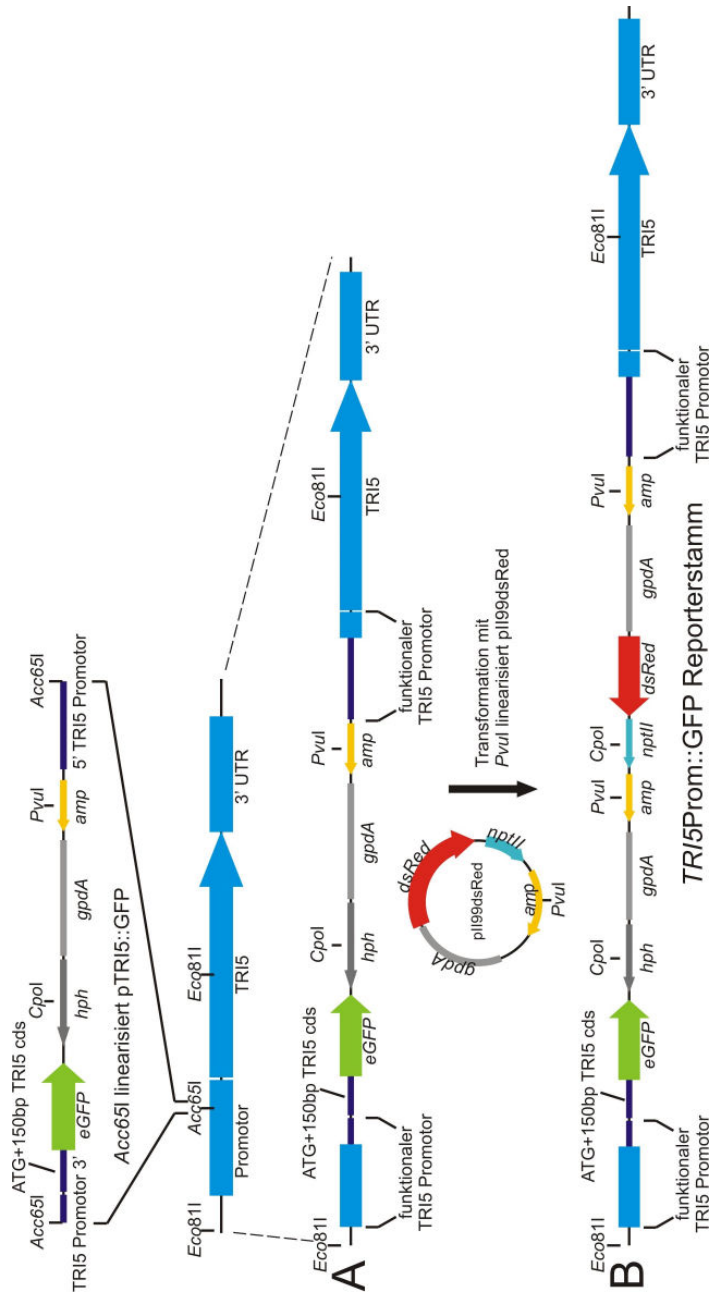


Abbildung 3.2.: Schematische Illustration der Integrationsereignisse, die zur Entstehung des finalen Reporterstammes *TRl5Prom::GFP* mit DsRed führten. **A** Das Plasmid *pTRl5::GFP*, das das *TRl5*-Promotor-GFP-Konstrukt enthält, wurde mit dem Restriktionsenzym *Acc65I* innerhalb der Promotorsequenz linearisiert. Dies führte zu einem „Single-Crossover“ in der gewünschten genomischen Region des WT. Die Integration verdoppelte den *TRl5*-Promotor durch eine Verschmelzung der nativen Sequenz mit der des Plasmids. Sowohl das *TRl5*-Gen als auch das *GFP*-Gen befinden sich nun unter der Kontrolle des endogenen *TRl5*-Promotors. **B** Für die zweite Transformation wurde das Plasmid *pII99DsRed* innerhalb der *amp*-Sequenz mit dem Restriktionsenzym *PvuII* linearisiert, was somit eine gezielte Integration in das Rückgrat des bereits im Genom vorhandenen *pTRl5::GFP* möglich machte. Diese aufeinanderfolgenden Transformationen führten zu dem finalen Reporterstamm mit konstitutiver DsRed- und induzierbarer GFP-Expression. Die Restriktionsenzyme *Eco81I* und *CpoI* wurden in der Southern-Blot-Analyse verwendet um die genomische DNA zu restringieren. Erklärung der Abkürzungen: *hph*: Hygromycinresistenzkassette; *amp*: Ampicillinresistenzkassette; *gpdA*: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Promotor aus *A. nidulans*; *nptII*; Geneticinresistenzkassette. Abbildung entnommen aus Ilgen *et al.* (2009).

3. Ergebnisse



Abbildung 3.3.: Infektionstest auf Weizenpflanzen des cv. *Nandu*, 21 Tage nach Inokulation. Zwei gegenüberliegende Einzelblüten wurden mit 200 Konidien in 10 μ L H₂O zum Zeitpunkt der Anthese inokuliert. **A** Kontrollinokulation mit Wasser, **B** *TRI5*Prom::GFP Reporterstamm, **C** WT *Fg* 8/1. Nach 21 Tagen Infektion haben sowohl der WT als auch der Reporterstamm die inokulierte Ähre komplett befallen und zeigen die typischen Symptome der *Fusarium*-Ährenbleiche. Abbildung entnommen aus Ilgen *et al.* (2009).

Die positive Transformante mit der Transformationsnummer 864.6.1 wurde ausgewählt, um in einer zweiten Transformation den zweiten Fluoreszenzmarker (DsRed) zu erhalten. Dazu wurde aus dem Plasmid pPgpD-DsRed das *gpdA*-Promotor getriebene *DsRed*-Gen über die Schnittstellen *Eco*RI und *Hind*III isoliert und in den Vektor pII99 transferiert. Der resultierende Vektor pII99DsRed trägt nun das *DsRed*-Gen sowie den für die Selektion nötigen, zweiten Selektionsmarker *nptII*, der die Geneticin-Resistenz gewährleistet. Um mögliche Lokalisationseffekte durch eine zufällige Integration des DsRed-Vektors in das Genom auszuschließen, wurde pII99DsRed innerhalb des Ampicillin-Resistenzgens mit dem Restriktionsenzym *Pvu*I geöffnet und linearisiert. In der darauf folgenden Transformation der Primärtransformante 864.6.1 mit pII99DsRed sollte es zu einer homologen Rekombination innerhalb des Vektorrückgrates des bereits vorhandenen pTRI5::GFP kommen. Die aus dieser Transformation resultierenden Reporterstämme sollten nun die in Abbildung 3.2 B gezeigte genomische Situation aufweisen. Durch eine weitere Southern-Blot-Analyse mit einer DIG-markierten DsRed-Sonde konnte die Integration von pII99DsRed in den bereits vorhandenen pTRI5::GFP für die Transformanten mit den

3. Ergebnisse



Abbildung 3.4.: Infektionstest auf Mais des cv. A 188, 28 Tage nach Inokulation. **A** Kontrollinokulation mit Wasser, **B** *TRI5*Prom::*GFP*-Reporterstamm, **C** WT. Nach 28 Tagen Infektion haben sowohl der WT als auch der Reporterstamm den inokulierten Maiskolben komplett befallen und zeigen eine vollständige Kolbenfäule.

Transformationsnummern 904.8.1 und 905.7.1 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1 B). Für die weiterführenden Experimente wurde Transformante 905.7.1 ausgewählt und als Reporterstamm *TRI5*Prom::*GFP* bezeichnet. In Abbildung 3.2 sind nochmals alle Transformationsereignisse, die zu dem Reporterstamm *TRI5*Prom::*GFP* führten schematisch aufgeführt. Durch diese Klonierungsstrategie sollte der Reporterstamm in Bezug auf seine Pathogenität und Virulenz den selben Phänotyp wie der WT aufweisen. Zur Überprüfung wurden Weizenähren des cv. *Nandu* mit 10 μ L einer Konidien suspension (20K/ μ L) von *TRI5*Prom::*GFP* zum Zeitpunkt der Blüte inokuliert. Drei Wochen nach Inokulation waren die infizierten Ähren vollständig gebleicht und zeigten damit die typischen Symptome der *Fusarium*-Ährenbleiche, ebenso wie bei wildtypinokulierten Ähren, die als Infektionskontrolle dienten (Abb. 3.3). Auch die Infektion von Maiskolben des cv. A 188 zeigten keinen Unterschied zwischen dem WT und dem Reporterstamm (Abb. 3.4). Dieses Ergebnis weist auf den wildtypähnlichen Charakter des Reporterstammes während des Wachstums auf der Wirtspflanze hin. Durch die Infektionsversuche auf den Wirtspflanzen Weizen und Mais konnte gezeigt werden, dass der Reporterstamm *in planta* das selbe Infektionsverhalten zeigte wie der WT.

3. Ergebnisse

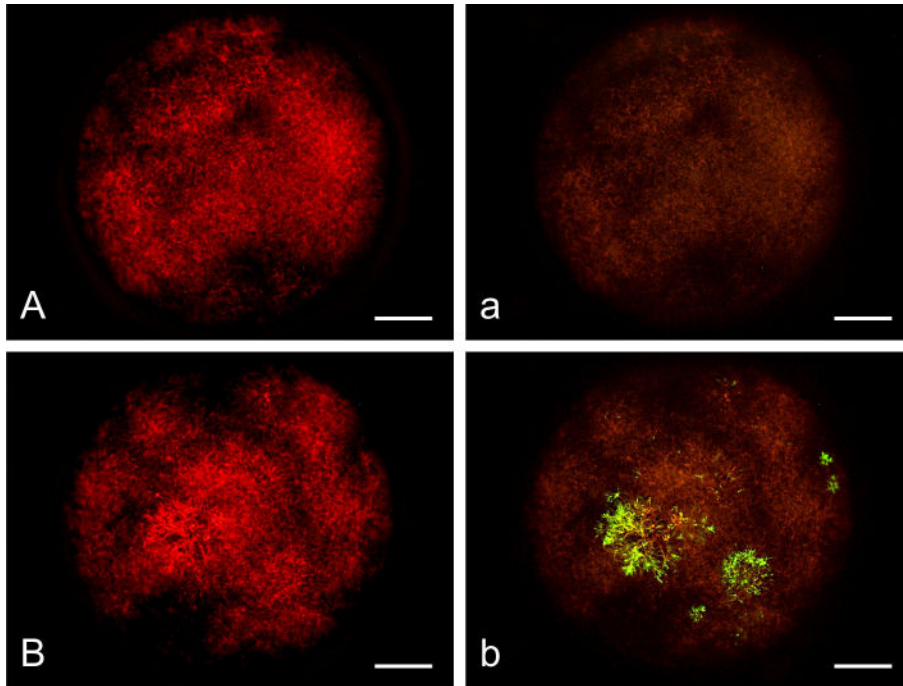


Abbildung 3.5.: Ergebnis des Induktionstest in MM mit 0,2 M Ammoniumsulfat (AS). Die Fluoreszenzbilder zeigen repräsentative Einzelkulturen einer 96-Lochplatte mit und ohne 0,2 M AS als Induktor; **A** nicht induzierte Kontrolle in DsRed und **a** GFP-Plus-Fluoreszenz; **B** induzierte Kultur in DsRed und **b** GFP-Plus-Fluoreszenz. In den induzierten Kulturen zeigen nur einzelne, definierte Teile des Myzels eine GFP-Induktion (Größenbalken 1 mm). Abbildung entnommen und modifiziert aus Ilgen *et al.* (2009).

Um zu überprüfen, ob die Genexpression des *TRI5*-Gens des Reporterstammes das gleiche Expressionslevel des WTs zeigt und die Expression des *GFP*-Gens einhergeht mit einer Expression des *TRI5*-Gens, wurde ein *in vitro*-Experiment durchgeführt. Dazu wurden 100 μ L Minikulturen in 96-Lochplatten unter *TRI5*-induzierenden Bedingungen angezogen. Die Zugabe von 0,2 M Ammoniumsulfat (AS) zu Minimalmedium (MM) führte nach vier Tagen zu einer eindeutigen GFP-Induktion, wie in Abbildung 3.5 zu sehen ist. Die Induktion der GFP-Fluoreszenz war nicht gleichmäßig in der Kultur verteilt, sondern blieb auf einen kleinen Teil des Myzels beschränkt (Abb. 3.5). Um zu überprüfen, ob die Genexpression des *TRI5*-Genclusters des Reporterstammes und des WTs unter den gewählten Bedingungen (MM + 0,2 M AS) übereinstimmen, wurden erneut Minikulturen in 96-Lochplatten angeimpft. Nach vier Tagen Kultivierung wurde das Myzel abgeerntet, vereinigt und die Gesamt-RNA isoliert sowie in cDNA umgeschrieben. In der darauf folgenden semiquantitativen PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des *TRI5*-Genclusters (genauer *TRI4* und *TRI5*) mit der Expression des *GFPs* und der

3. Ergebnisse

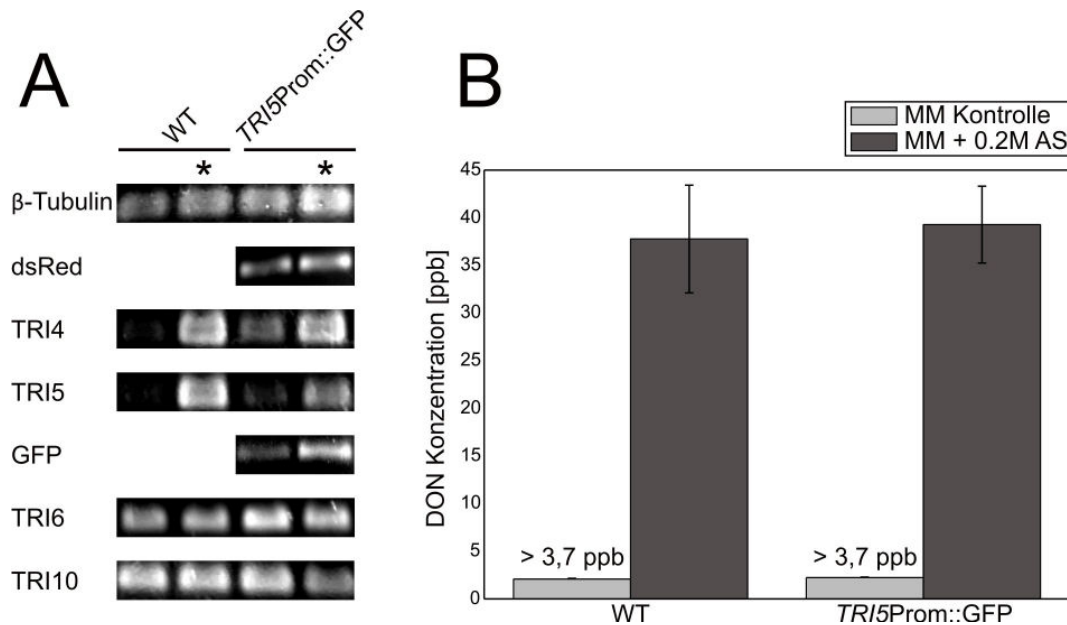


Abbildung 3.6.: Semiquantitative PCR und DON-Messung der Kulturen in MM mit 0,2 M Ammoniumsulfat. **A** Gelelektrophorese von RT-PCR-Produkten auf cDNA von WT und *TRI5*Prom::GFP Proben unter Kontroll- und Induktionsbedingungen mit 0,2 M AS (Standard-PCR Bedingungen, 30 Zyklen). Mit einem Asterik markierte Spalten zeigen das PCR-Produkt von *TRI5*-induziertem Myzel. **B** Repräsentative Messung der DON-Konzentration (in ppb) aus dem Mediumüberstand der induzierten Kulturen, die für die RT-PCR verwendet wurden. Das Diagramm zeigt den Mittelwert aus 12 Wiederholungen mit je acht gepoolten Proben; Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Messung wurde mit dem RIDASCREEN® DON Immunoassay (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Abbildung entnommen aus Ilgen *et al.* (2009).

beobachteten GFP-Fluoreszenz korreliert. Als Kontrolle dienen die PCR-Produkte von β -Tubulin sowie DsRed. Sowohl *TRI4* als auch *TRI5* zeigen ein stark erhöhtes Expressionslevel in den induzierten Kulturen, ebenso wie *GFP* (Abb. 3.6 A). Die Expression von *TRI6* und *TRI10*, beides Gene involviert in die Regulation des *TRI5*-Genclusters, zeigt ein annähernd gleiches Transkriptlevel unter induzierenden wie unter Kontrollbedingungen. Im Überstand der Kulturen wurde als letzter Schritt die Menge des gebildeten Toxins DON bestimmt. Dies erfolgte mit dem kommerziellen Toxintest RIDASCREEN® DON Immunoassay der Firma R-Biopharm AG. In den nicht induzierten Kulturen lag die DON-Konzentration sowohl beim WT als auch bei *TRI5*Prom::GFP, unterhalb des Detektionslimits des Messkits. Bei den mit Ammoniumsulfat induzierten Kulturen lag die DON-Konzentration dagegen bei beiden Stämmen bei etwa 37-38 ppb. (Abb. 3.6 B).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Klonierung des GFP-Reporterstammes sowie seine wildtypähnlichen Eigenschaften in Bezug auf die Infektion auf der Pflanze,

3. Ergebnisse

die *TRI5*-Induzierbarkeit und die gebildete Toxinmenge. Diese Vortests waren nötig, um aus den später folgenden histologischen Untersuchungen Rückschlüsse auf die Induktion des Trichothecenbiosyntheseweges im WT ziehen zu können.

3.2. Histologie infizierter Weizenähren

Das Ziel der Klonierung des GFP-Reporterstammes war es, den Verlauf der Infektion und die Induktion der Trichothecenbiosynthese während des Wachstums von *F. graminearum* auf der Pflanze visualisieren zu können. Dazu wurden Weizenährchen zum Zeitpunkt der Anthese mit 200 Konidien des Reporterstammes *TRI5*Prom::*GFP* inokuliert und der Infektionsverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten (dpi, „days post inoculation“, Tage nach Inokulation) vom Beginn bis zum Ende des Infektionszyklus nach 21 Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt und dokumentiert. In den folgenden Abschnitten werden die herausragendsten Ergebnisse dieser Versuche gezeigt und erklärt. Eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung des Infektionsverlaufes auf Mais konnte aufgrund der sehr hohen Eigenfluoreszenz des Maisgewebes nicht sinnvoll durchgeführt werden. Ebenso wurden Infektionsversuche an dem resistenten cv. *Sumai-3* durchgeführt. Dieses Kultivar ist zwar resistent gegen eine Infektion von *F. graminearum*, allerdings sehr suszeptibel gegen einen Befall mit Mehltau. Massive Probleme mit einer Primärinfektion von *Sumai-3* durch Mehltau verhinderten weitere Infektionsversuche mit dem Reporterstamm, daher wird im Folgenden nur auf die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Längs- und Querschnitten infizierter Weizenähren des suszeptiblen cv. *Nandu* näher eingegangen.

3.2.1. *TRI5* zeigt eine gewebespezifische Induktion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse zu der Induktion der Trichothecenbiosynthese von *F. graminearum* während des Befalls von Weizen zu erhalten. Der wildtypähnliche Reporterstamm zeigt eine konstitutive DsRed-Expression und eine GFP-Expression, die von dem endogenen *TRI5*-Promotor gesteuert wird. Dieser Fluoreszenzstamm ermöglicht es, die Expression von *TRI5* und damit die Induktion der Mykotoxinbiosynthese auf der Pflanze unter natürlichen Infektionsbedingungen zu verfolgen und zu dokumentieren. Weizenähren des cv. *Nandu* wurden zum Zeitpunkt der Anthese mit 200 Konidien (10 μ L, 20 Konidien/ μ L) inokuliert und der Verlauf der *Fusarium*-Ährenbleiche über einen Zeitraum von drei Wochen verfolgt. Infizierte Ähren wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und histologische Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf DsRed- und GFP-Expression untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden näher aufgeführt.

3. Ergebnisse

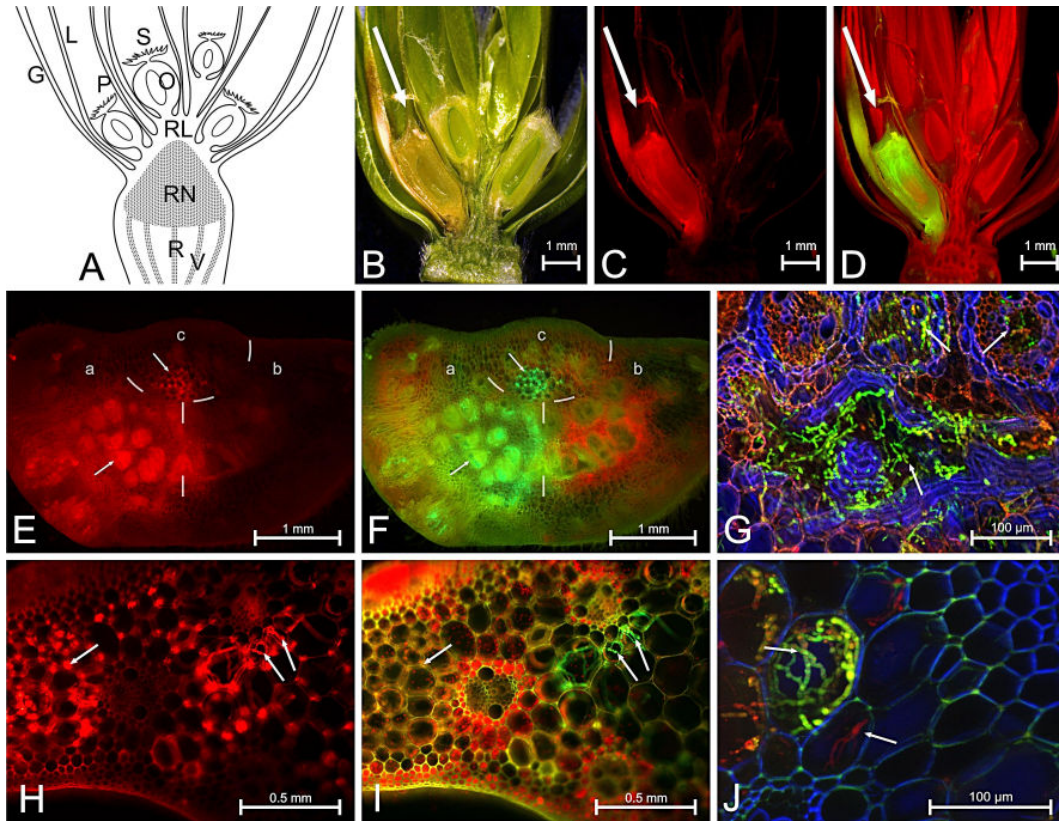


Abbildung 3.7.: Fluoreszenzbilder von *TRI5*Prom::GFP-infizierten Weizenähren (cv. *Nandu*), geschnitten und mikroskopisch untersucht nach verschiedenen Zeitpunkten. **A** Schemazeichnung eines Längsschnitts durch ein Weizenährchen, modifiziert nach Kang und Buchenauer (2000): Glume (G, Hüllspelze), Lemma (L, Deckspelze), Palea (P, Vorspelze), Stigma (S, Narbe), Ovar (O, Fruchtknoten), Rachilla (RL), Rachisknoten (RN), Rachis (R) und Vaskulargefäße (V). **B - D** Längsschnitt durch ein *TRI5*Prom::GFP-infiziertes Ährchen nach 3 dpi (Pfeile markieren Inokulationspunkt). **B** Unter Aufsicht werden eine Verbräunung und Bleichung der infizierten Blüte sichtbar. **C** Unter DsRed-anregenden Bedingungen wird die komplette Kolonisierung der Karyopse sichtbar. **D** Gleichzeitig zeigt dieses Gewebe auch eine starke GFP-Expression (GFP-Plus). **E - G** Aufsicht auf einen Querschnitt durch den Rachisknoten eines infizierten Ährchens, 4 dpi: a) Rachisknoten unter der inokulierten Blüte des Ährchens, b) Rachisknoten unter der benachbarten, nicht inokulierten Blüte, c) Rachis, die zu den oberen und unteren Ährchen führt. **E** (DsRed-Fluoreszenz) Das Gewebe zwischen den Leitgefäßen innerhalb des Rachisknotens wurde kolonisiert (a, unterer Pfeil). Zusätzlich lässt sich Myzel im Apoplasten der Parenchymzellen der Rachis beobachten (c, Pfeil oben). **F** (GFP-Plus) Das Myzel innerhalb des Rachisknotens, sowohl in der Rachis als auch zwischen den Leitgefäßen, zeigt GFP. **G** Vergrößerter Blick auf die zentrale Region des Rachisknotens, 4 dpi. Das Gewebe zwischen den Vaskulargefäßen (Pfeil unten) als auch einige Leitgefäße selbst (Pfeile oben) sind vollständig kolonisiert und zeigen eine hohe *TRI5*-Aktivität. Überlagerung von Einzelbildern, aufgenommen unter DsRed- und GFP-anregenden Bedingungen sowie unter Anregung der Zellwandautofluoreszenz bei 335-383 nm Wellenlänge. **H - J** Querschnitt durch die Rachis unter einem inokulierten Ährchen, 5 dpi. Die Rachis ist voll bewachsen, die Mehrheit der Hyphen wächst im Apoplasten zwischen den Parenchymzellen (**H**, Pfeil links) in dem keine GFP-Fluoreszenz beobachtet wurde (**H** und **I**, Pfeil links). Dort, wo der Reporterstamm intrazellulär in den Parenchymzellen wächst, lässt sich eine Induktion von GFP beobachten (**H** und **I**, rechte Pfeile). **J** Höhere Vergrößerung eines Rachisquerschnittes, 5 dpi. Das meiste intrazellulär wachsende Myzel zeigt GFP-Expression (Pfeil oben), jedoch finden sich auch innerhalb von Zellen wachsende Hyphen die nur DsRed-Fluoreszenz aufweisen (Pfeil unten). Überlagerung von Einzelbildern, aufgenommen unter DsRed- und GFP-anregenden Bedingungen sowie unter Anregung der Zellwandautofluoreszenz bei 335-383 nm Wellenlänge. Abbildung entnommen aus Ilgen *et al.* (2009)

3. Ergebnisse

Die Antheren, die sich zum Zeitpunkt der Anthese aus der geschlossenen Blüte nach Außen schieben, zeigen nach zwei bis drei Tagen eine sehr starke Kolonisierung auf der Oberfläche des inokulierten Weizenährchens (nicht gezeigt). Die Oberfläche der Antheren wird vollständig von einem sehr dichten Myzel bewachsen, das jedoch nur die konstitutive DsRed-Fluoreszenz aufweist. Da das Inokulum in das Innere des Ährchens eingebracht wird, zeigt eine Kolonisierung der Antheren auf der Außenfläche eine sehr schnelle Kolonisierung des gesamten Blütenraums. Im gleichen Zeitraum (2-3 dpi) hat der Reporterstamm das Karyopsengewebe infiltriert und sich darin ausgebreitet. Hier zeigt sich im zeitlichen Verlauf der Infektion die erste GFP-Fluoreszenz im pflanzlichen Gewebe. Ein Querschnitt durch ein *TRI5*Prom::GFP-infiziertes Ährchen zeigt eine sehr starke Aktivierung des *TRI5*-Promotor-GFP-Konstruktes in dem Gewebe der Karyopse (Abb. 3.7 A-D). Nach drei Tagen Infektion lässt sich eine deutliche Verbräunung der Hüllblätter und auch der Karyopse erkennen (Abb. 3.7 B). Unter DsRed- bzw. GFP Plus-Anregung zeigt sich ein starker Befall der Karyopse, sowie bereits eine Ausbreitung des Pathogens in den Blütenboden. Wie in Abbildung 3.7 D unter GFP Plus-Anregung zu sehen ist, zeigt der Reporterstamm eine sehr starke Induktion des GFP-Konstruktes in diesem Gewebe. Eine nähere Betrachtung einer infizierten Karyopse mit einer höheren Vergrößerung zeigt einen vollständigen Bewuchs des Blütenorgans und eine starke Induktion der GFP-Fluoreszenz und damit der *TRI5*-Expression.

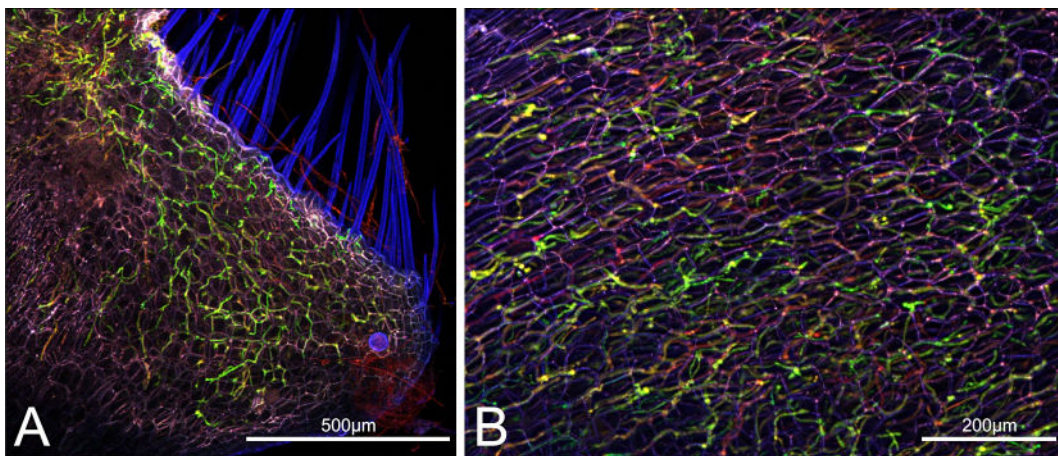


Abbildung 3.8.: Expression von *TRI5* in der Karyopse, 3dpi. Maximale-Intensitätsprojektion eines Längsschnitts durch eine infizierte Karyopse des Weizenkultivars *Nandu*. **A** Drei Tage nach Inokulation hat sich der Reporterstamm bereits in dem kompletten Gewebe ausgebreitet. Alle Myzelfäden, die innerhalb des Gewebes wachsen, zeigen eine starke GFP-Induktion, während das Myzel außerhalb (zwischen den Trichomen) nur die konstitutive DsRed-Fluoreszenz aufweist. **B** Detailaufnahme, Maximale-Intensitätsprojektion einer infizierten Karyopse. Die GFP-Reportermutante zeigt eine starke Induktion der Trichothecenbiosynthese in dem Karyopsengewebe.

3. Ergebnisse

Die Abbildung 3.8 A zeigt eine Maximum-Intensitätsprojektion einer Stapelaufnahme einer infizierten Karyopse nach drei Tagen Infektion. Das Myzel auf der Oberfläche der Karyopse, zwischen den blau autofluoreszierenden Trichomen, zeigt nur die konstitutive DsRed-Fluoreszenz. Die Aktivierung des *TRI5*-Promotors findet also nur innerhalb des Karyopsengewebes statt. Abbildung 3.8 B zeigt ebenfalls eine Maximum-Intensitätsprojektion einer Stapelaufnahme des Karyopsengewebes. Hier wird deutlich, wie stark und dicht die Zellmatrix des Fruchtknotens von den Hyphen des Reporterstammes durchwachsen ist, und dass nahezu jede Hyphe eine Induktion der Trichothecenbiosynthese (GFP-Fluoreszenz) signalisiert. Nach etwa vier Tagen hat sich das Myzel von der Karyopse und dem Blütenboden ausgehend bis in den Rachisknoten ausgebreitet. In diesem Bereich verzweigen sich die Leitbündel aus der Rachis und führen in das Ährchen, um dieses mit Nährstoffen und Wasser zu versorgen. Dieser Bereich wies die massivste Induktion des *TRI5*-Promotor-GFP-Konstruktes auf, die auf der Pflanze beobachtet wurde (Abb. 3.7 E-G; Abb. 3.10 A, B). Das Myzel wächst hier größtenteils intrazellulär in den Zellen zwischen den Leitbündeln, wie in Abbildung 3.7 F und G zu erkennen ist. Zum Teil konnten hier auch Hyphen beobachtet werden, die innerhalb der Phloemzellen des Leitgewebes wuchsen (Abb. 3.7 G, Pfeile oben). Möglicherweise ist der Bereich des Rachisknotens auch der Eintrittspunkt von *F. graminearum* in das Leitgefäßsystem, durch das sich der Pilz im späteren Verlauf der Infektion in der Ähre ausbreitet. Während des weiteren Infektionsverlaufes breitet sich *F. graminearum* durch die Rachis in der Ähre aus und befällt von ihr ausgehend Ährchen, die über oder unter der initialen Infektionsstelle liegen. Der Reporterstamm zeigt, dass das Wachstum innerhalb der Rachis vorwiegend interzellulär stattfindet. Hier wachsen die Hyphen zwischen den Zellen und zeigen keinerlei GFP-Induktion (Abb. 3.7 H-I, linker Pfeil; Abb. 3.10 C). Nur dort, wo das Myzel in das Innere einer Parenchymzelle gelangt, kommt es zu einer Induktion des GFP-*TRI5*-Promotorkonstruktes, wie in Abbildung 3.7 I (rechte Pfeile) und J zu sehen ist. Das interzelluläre Wachstum der Hyphen geht zu späteren Zeitpunkten (5-7 dpi) in ein intrazelluläres Wachstum über.

Abbildung 3.9 zeigt eine Maximum-Intensitätsprojektion der Stapelaufnahme eines Querschnittes durch die Rachis unterhalb des infizierten Ährchens. Hier breiten sich die Hyphen nicht mehr vertikal, sondern horizontal im Gewebe aus, durchbrechen die Zellwände und wachsen intrazellulär. Die intrazellulär wachsenden Hyphen weisen eine starke Aktivierung des *TRI5*-Promotor-GFP-Konstruktes auf. Erreicht das Myzel auf seinem Infektionsweg durch die Weizenähre einen neuen Rachisknoten zeigt sich ein ähnliches Bild wie im Falle des inoklierten Ährchens, nur verläuft hier das Wachstum in umgekehrter Richtung. Die Hyphen wachsen aus der Rachis in den Rachisknoten ein und zeigen hier wieder eine sehr hohe GFP-Fluoreszenz. Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 3.10: Die

3. Ergebnisse

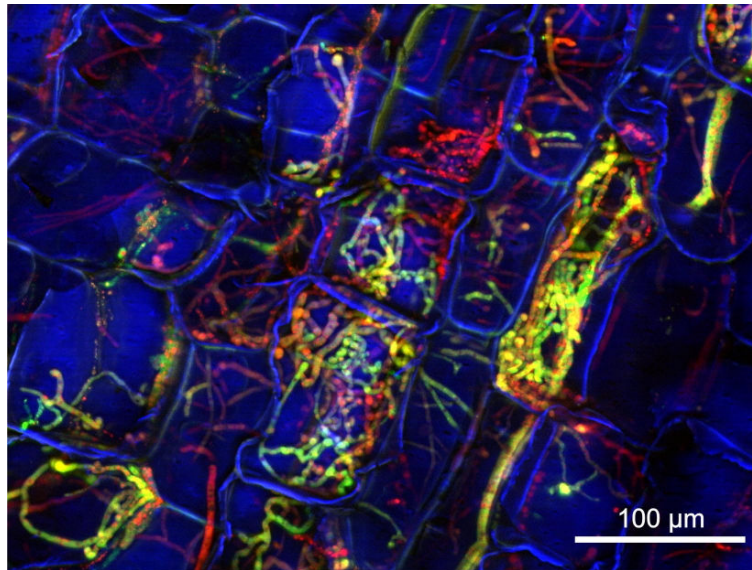


Abbildung 3.9.: GFP-Induktion in Parenchymzellen der Rachis, 5 dpi. Maximum-Intensitätsprojektion einer Stapelaufnahme eines Querschnittes durch die Rachis unterhalb des infizierten Ährchens. Die Mehrheit der Hyphen innerhalb der Rachis wächst interzellulär. Nur dort, wo das Myzel in die Parenchymzellen eindringt, zeigt sich eine Aktivierung des GFP-*TRI5*-Promotorkonstruktes und deutet auf eine Induktion der Trichothecenbiosynthese hin.

interzellulär wachsenden Hyphen zeigen keine GFP-Induktion, während die Hyphen, die in den Rachisknoten eindringen, eine hohe Aktivität von *TRI5*Prom::GFP zeigen. Nach etwa 10 bis 14 Tagen ist die Ähre bereits vollständig kolonisiert und es kommt zu einer starken Kolonisierung der Leitbündel, hier insbesondere des Phloems (Abb. 3.11 A). Die hier wachsenden Hyphen zeigen eine GFP-Fluoreszenz, welche auf eine destingierte *TRI5*-Induktion in diesem Bereich hindeutet. Das Wachstum und die Trichothecenproduktion in den Leitgefäßen der Weizenähre tragen zu dem äußerlichen Erscheinungsbild (gebleichte und verbräunte Ähren) der *Fusarium*-Ährenbleiche bei. In der Regel ist die vollständige Kolonisierung einer Weizenähre nach drei Wochen abgeschlossen und die Wachstumsfront von *F. graminearum* erreicht den Halm der Weizenpflanze. Auch hier zeigt sich eine massive Besiedelung des Gewebes sowie der Leitbündel (Abb. 3.11 B, C). Im Gegensatz zum Wachstum innerhalb der Ähre zeigt sich hier keinerlei GFP-Induktion während der letzten Stadien des *F. graminearum*-Befalls, abgesehen von einzelnen Hyphen im untersten Nodium der Ähre (Abb. 3.11 B, Pfeil). Innerhalb des Halms breitet sich der Pilz vorwiegend an der Oberfläche der Parenchymzellen aus, die den Hohlraum innerhalb des Stängels auskleiden. Querschnitte durch einen Bereich des Stängels etwa 5 cm unterhalb der Ähre zeigen, dass das Myzel die Atemhöhlen unterhalb der Stomata kolonisiert.

3. Ergebnisse

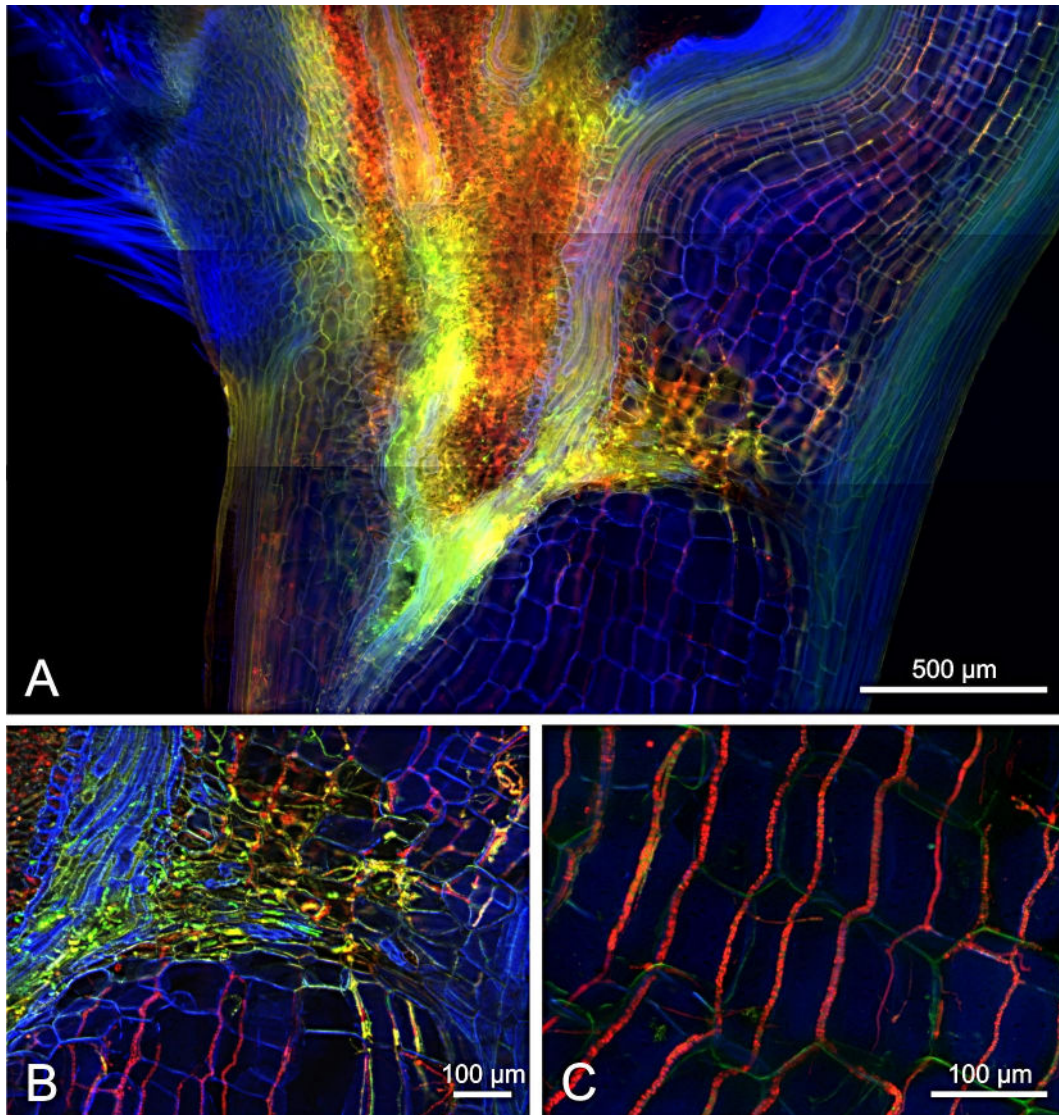


Abbildung 3.10.: Längsschnitt durch die Rachis unterhalb des infizierten Ährchens, 4dpi. **A** „Composite“-Bild, zusammengesetzt aus 12 Einzelbildern. Vier Tage nach Inokulation hat der Reporterstamm bereits die Rachis überwunden und beginnt sich über die Rachis in die oberen und unteren Ährchen auszubreiten. Innerhalb des Rachisknotens zeigt *TRI5*Prom::*GFP* eine hohe GFP-Fluoreszenz, die sich in der Rachis deutlich abschwächt. **B** Detailaufnahme, eine Maximum-Intensitätsprojektion einer Stapelaufnahme des Rachisknotens. Deutlich zu sehen ist die starke GFP-Induktion in diesem Bereich der Ähre. **C** Detailaufnahme, eine Maximum-Intensitätsprojektion einer Stapelaufnahme der angrenzenden Rachis. Hier wächst das Myzel vorwiegend innerhalb des Apoplasten und zeigt nur ein konstitutive DsRed-Fluoreszenz.

3. Ergebnisse

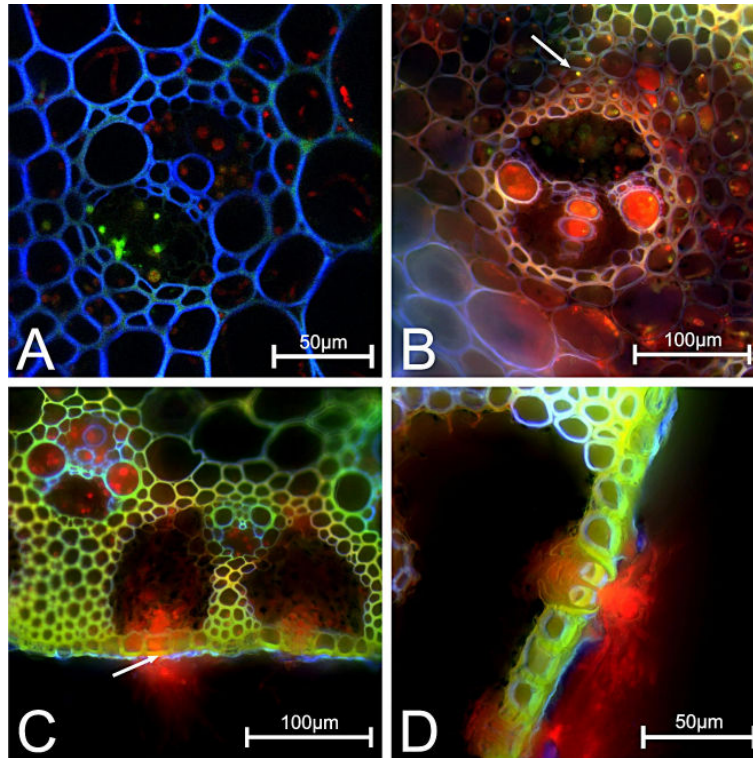


Abbildung 3.11.: Fluoreszenzbilder späterer Infektionsstadien. **A** Laser-Scanning-Mikroskopie eines Querschnitts durch die Rachis unterhalb des inokulierten Ährchens nach 10 dpi. Der *TRI5*Prom::GFP-Reporterstamm hat das Gewebe bereits vollständig kolonisiert und wächst sowohl im Parenchym als auch in den Leitbündeln. *TRI5*-Induktion ist beschränkt auf das Phloem. Die Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand wurde mit einem 405 nm Laser angeregt, um die Fluoreszenzsignale von GFP und DsRed besser von der Zellwand zu unterscheiden. **B - D** Fluoreszenzmikroskopiebilder von Querschnitten durch den Stängel, 22 dpi. **B** Der Reporterstamm hat das Gewebe bis hin zum letzten Nodium der Weizenähre vollständig kolonisiert. Einzelne Hyphen zeigen GFP-Fluoreszenz (Pfeil). **C** Querschnitt durch den Stängel, 5 cm unterhalb der Ähre. Die Leitgefäße sind vollständig infiziert und Hyphen wachsen in Richtung der Stomata und der Halmoberfläche (Pfeil). Alle Hyphen zeigen DsRed-, aber keine GFP-Fluoreszenz. **D** Myzel wächst aus den Stomata und erreicht die Oberfläche des Stängels. Abbildung entnommen aus Ilgen *et al.* (2009).

Diese Stomata sind auch die Austrittstore des Myzels, um die Halmoberfläche zu kolonisieren (Abb. 3.11 C, D). Um zu überprüfen, ob die beobachtete GFP-Fluoreszenz und damit auch Toxinbiosynthese mit der Expression der assoziierten Gene übereinstimmt, wurde RNA aus infizierten Rachisknoten und der angrenzenden Rachis isoliert. In einer RT-PCR wurde diese in cDNA umgeschrieben und die Expression anschließend in einer semiquantitativen PCR bestimmt (Abb. 3.12). Dabei zeigte sich, dass die Expression von *TRI5* im Rachisknoten gegenüber der Rachis um ein Vielfaches erhöht ist. Gleichzeitig zeigt sich auch hier wieder, dass die Expression von *GFP* der von *TRI5* entspricht, und damit die beobachtete Fluoreszenz auf eine drastisch gesteigerte Trichothecenbiosynthese

3. Ergebnisse

hindeutet. Die Expression des Transkriptionsfaktors *TRI6* ist in den Rachisproben ebenfalls deutlich verringert. Als Referenzgene dienten in dieser PCR wiederum *β-Tubulin* und *DsRed*.

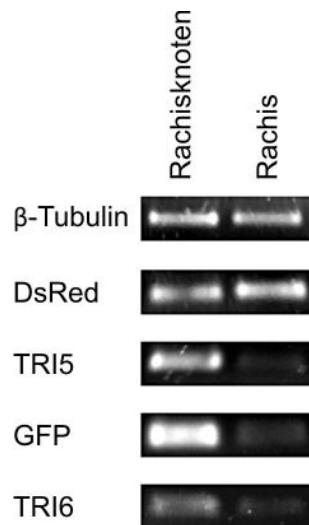


Abbildung 3.12.: Gelelektrophorese einer semiquantitativen PCR aus infiziertem pflanzlichen Gewebe nach 4 dpi (Standard-PCR-Bedingungen, 32 Zyklen). Die Expression von *TRI5* und *GFP* im Rachisknoten ist deutlich hochreguliert im Vergleich zur Expression dieser Gene in der benachbarten Rachis. Die Expression von *TRI5* spiegelt die von *GFP* wieder. Abbildung entnommen aus Ilgen *et al.* (2009).

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Infektionsverlaufes des Fluoreszenz-Reporterstammes auf Weizenähren, cv. *Nandu*, ergaben eine strikt regulierte Induktion der Trichothecenbiosynthese während des Wachstums auf der Pflanze. Die Expression von *TRI5* ist nicht ubiquitär während der Infektion aktiv, sondern wird gewebespezifisch induziert. Die Karyopse und der Rachisknoten sind die pflanzlichen Gewebe, in denen eine sehr hohe Aktivität des *TRI5*Prom::GFP-Konstruktes beobachtet wurde. In der Rachis breitet sich *F. graminearum* vorzugsweise interzellulär aus, wobei hier kaum GFP-Fluoreszenz beobachtet wurde. Zu späteren Infektionszeitpunkten breitet sich das Myzel horizontal in den Pflanzenzellen aus und zeigt intrazellulär wachsend eine Induktion des *TRI5*-Promotors. Die Unterschiede in der Expression von *TRI5* zwischen dem Rachisknoten und der Rachis konnten durch eine RT-PCR-Untersuchung auf molekularer Ebene bestätigt werden.

3.3. Screening auf *TRI5*-induktive Substanzen

Die Inokulationsversuche auf Weizenpflanzen ergaben Hinweise darauf, dass die Trichothecenbiosynthese einer engen und hochspezifischen Regulation unterliegt. Um Rückschlüsse auf die Vorgänge während der Kolonisierung von pflanzlichem Gewebe ziehen zu können, wurde ein einfacher Assay etabliert mit dem *TRI5*-induzierende Substanzen identifiziert werden konnten. Dazu wurden Minikulturen in 96-Lochplatten angezogen und ihr Verhalten bezüglich des Wachstums und der GFP-Induktion in verschiedenen Medien unter Einfluss verschiedener Substanzen untersucht.

Dabei stellte sich heraus, dass die Wahl des Mediums in dem die Pilzkultur angezogen wird, eine bedeutende Rolle in der Induktion von GFP und damit auch des *TRI5*-Gens spielt. Die Kultivierung auf Festmedium in den 96-Lochplatten wurde nach einigen Vorversuchen eingestellt, da durch die Zugabe von Agar die Eigenfluoreszenz des Medium sowohl in der GFP- als auch in der DsRed-Emission zu hoch war, um verlässliche Fluoreszenzdaten aufzeichnen zu können.

In Abbildung 3.13 ist die Entwicklung von zwei Induktionsplatten mit flüssigem Minimalmedium als Grundmedium und unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat über einen Zeitraum von vier Tagen aufgezeigt. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass das in diesen Experimenten verwendete Minimalmedium (MM) sowie Kompletmedium (CM) mit Lösung A (CaNO_3 ; siehe Material und Methoden, Abschn. 2.4.1, S. 12) hergestellt wurde. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid (NH_4Cl) und Ammoniumnitrat (NH_4NO_3) bedeuten also einen *zusätzlichen* Eintrag von Stickstoff. In jedem Experiment bestand die Kontrolle aus unverändertem Medium (ohne Zusatz).

Die Originalwerte der Fluoreszenzmessung von DsRed und GFP wurden hier unverändert aufgetragen, um die Entwicklung und die Zunahme der Fluoreszenz und auch das Verhältnis der einzelnen Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen über die Zeit besser herauszustellen. Die Fluoreszenzwerte der Kontrolle (reines Medium, schwarze Linie, DsRed und GFP) zeigen auf beiden 96-Lochplatten den gleichen Verlauf. Die Zunahme der Fluoreszenzen sind in den ersten 24 bis 48 h nur sehr gering. Zwischen 48 h und 72 h gibt es einen deutlichen Anstieg in den gemessenen Werten für DsRed, der sich bis zu dem Ende der Messung bei 96 h fortsetzt. Da das Fluoreszenzprotein DsRed konstitutiv exprimiert wird, kann die gemessene Fluoreszenz mit dem Wachstum gleichgesetzt werden und zeigt hier über die Zeit von 96 h ein lineares Wachstum an. In dem Assay mit Ammoniumchlorid fällt auf, dass die DsRed-Fluoreszenzwerte für die einzelnen Konzentrationen stark hinter denen der Kontrolle zurückbleiben. Nur die beiden

3. Ergebnisse

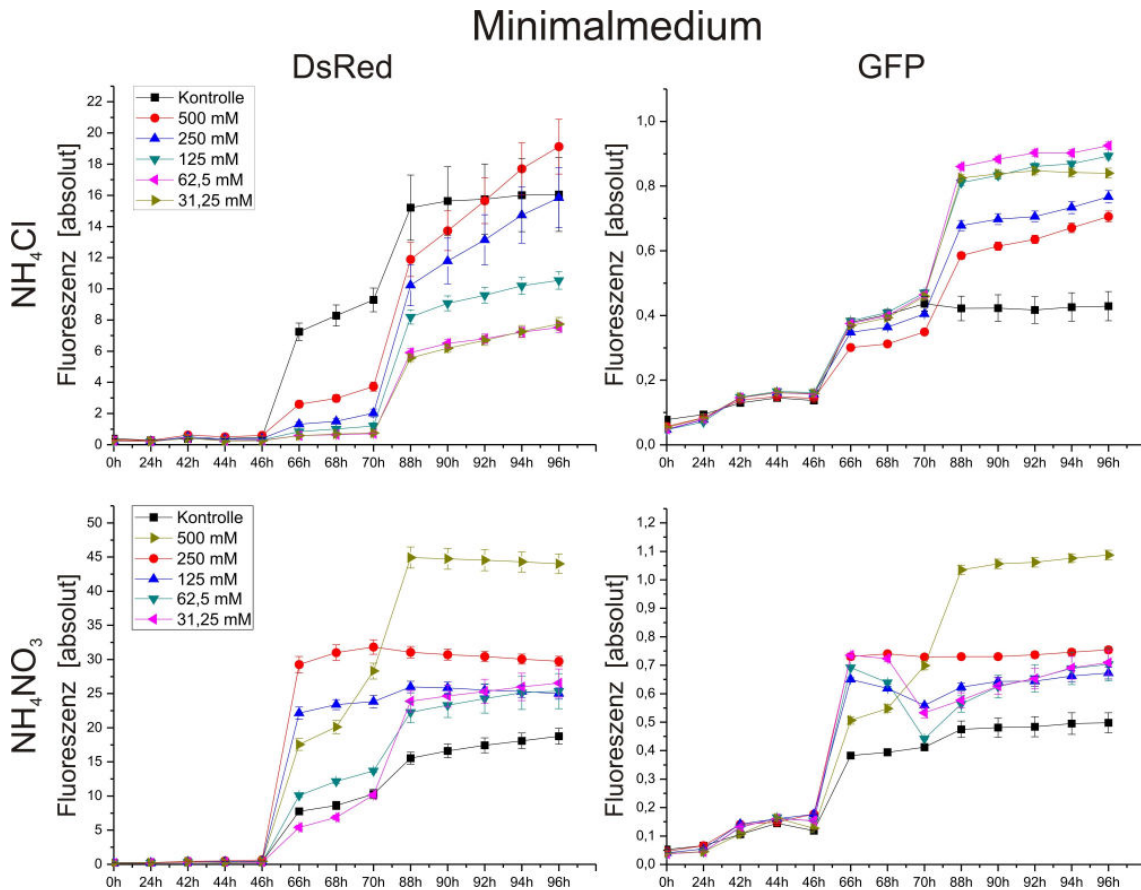


Abbildung 3.13.: Fluoreszenzmessung von Minikulturen in Minimalmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von NH_4Cl und NH_4NO_3 über einen Zeitverlauf von vier Tagen. Die Graphen zeigen den Mittelwert der unverrechneten Originalwerte aus den Fluoreszenzmessungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über 16 Wiederholungen (16 Minikulturen).

höchsten Konzentrationen (500 mM und 250 mM) kommen nach 96 h an das Niveau der Kontrolle heran bzw. auch darüber hinaus (500 mM). Die niedrigeren Konzentrationen von 125 mM und darunter scheinen das Wachstum der Minikulturen negativ zu beeinflussen. Im Vergleich zu den GFP-Fluoreszenzwerten zeigt sich jedoch, dass ausnahmslos alle Konzentrationen von NH_4Cl eine GFP-Induktion induzieren. Interessant hierbei ist, dass die niedrigste Konzentration, die auch die niedrigsten DsRed-Werte zeigt, die höchste GFP-Fluoreszenz aufweist. Danach folgen, in umgekehrter Reihenfolge der DsRed-Werte, die höheren Konzentrationen bis 500 mM, wobei auch diese Konzentration eine deutlich höhere GFP-Fluoreszenz aufweist als die Kontrolle. Der Assay mit NH_4NO_3 zeigt in dem Verlauf der DsRed-Fluoreszenz ein etwas anderes Bild. Hier zeigt sich eine sehr starke Zunahme der DsRed-Fluoreszenz zwischen 48 h und 72 h, die ein Vielfaches der

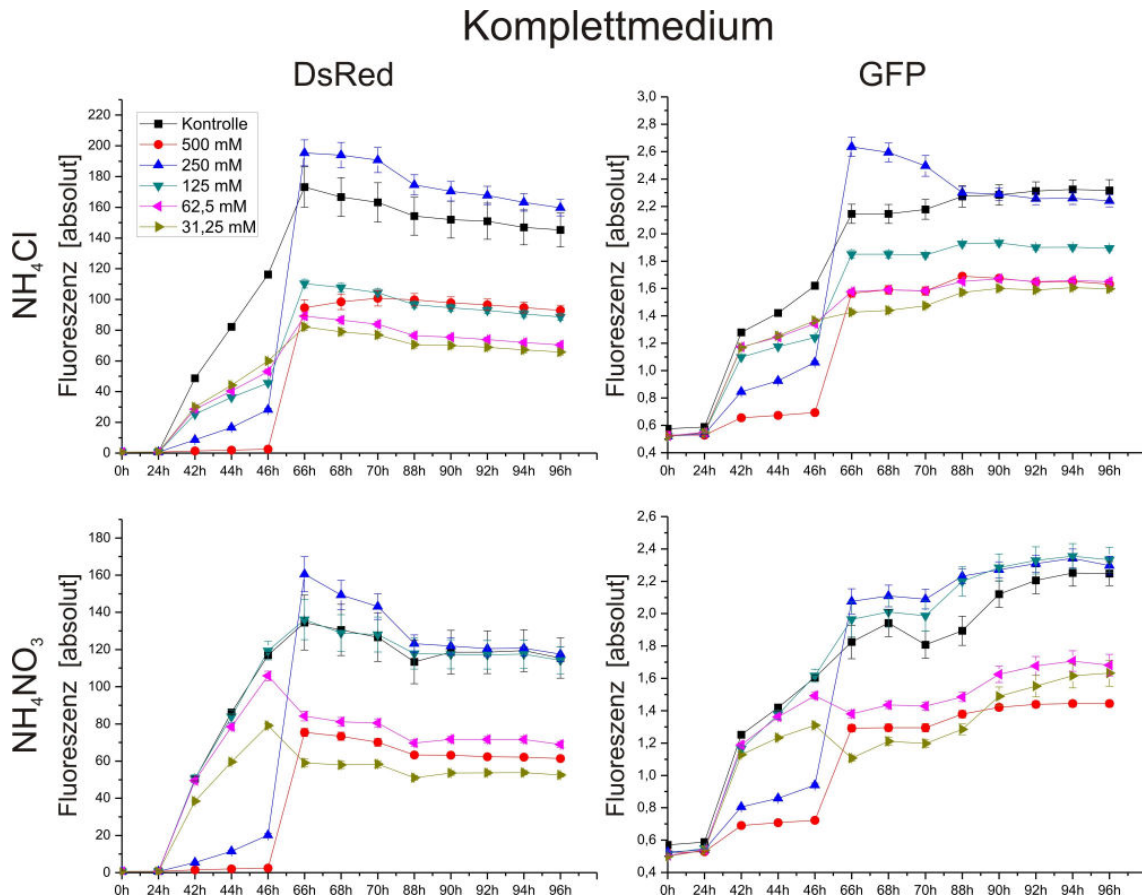


Abbildung 3.14.: Fluoreszenzmessung von Minikulturen in Komplettmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von NH_4Cl und NH_4NO_3 über einen Zeitverlauf von vier Tagen. Die Graphen zeigen den Mittelwert der unverrechneten Originalwerte aus den Fluoreszenzmessungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über 16 Wiederholungen (16 Minikulturen).

Kontrollfluoreszenz beträgt. Im Falle von 500 mM NH_4NO_3 sogar das dreifache der DsRed-Fluoreszenz der Kontrolle. In Ammoniumnitrat zeigen alle Konzentrationen ein stärkeres Wachstum als die Kontrolle, jedoch lässt sich eine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der zum Medium gegebenen Konzentration erkennen. Diese Abhängigkeit lässt sich auch bei der GFP-Fluoreszenz erkennen. Die höchste Konzentration an NH_4NO_3 zeigt ebenfalls die höchste GFP-Fluoreszenz, die mit den niedrigeren Konzentrationen auch deutlich abnimmt. Aber auch hier liegen die Werte über denen der Kontrolle.

Die Abbildung 3.14 zeigt den Verlauf der DsRed und GFP-Fluoreszenzen ebenfalls im Zusammenhang mit unterschiedlichen Konzentrationen von NH_4Cl und NH_4NO_3 , allerdings in Komplettmedium. Dieses Medium zeichnet sich zuerst einmal durch die gleichen Komponenten wie Minimalmedium aus, jedoch sind mit der Zugabe des Hefeextrakt-Mixes

3. Ergebnisse

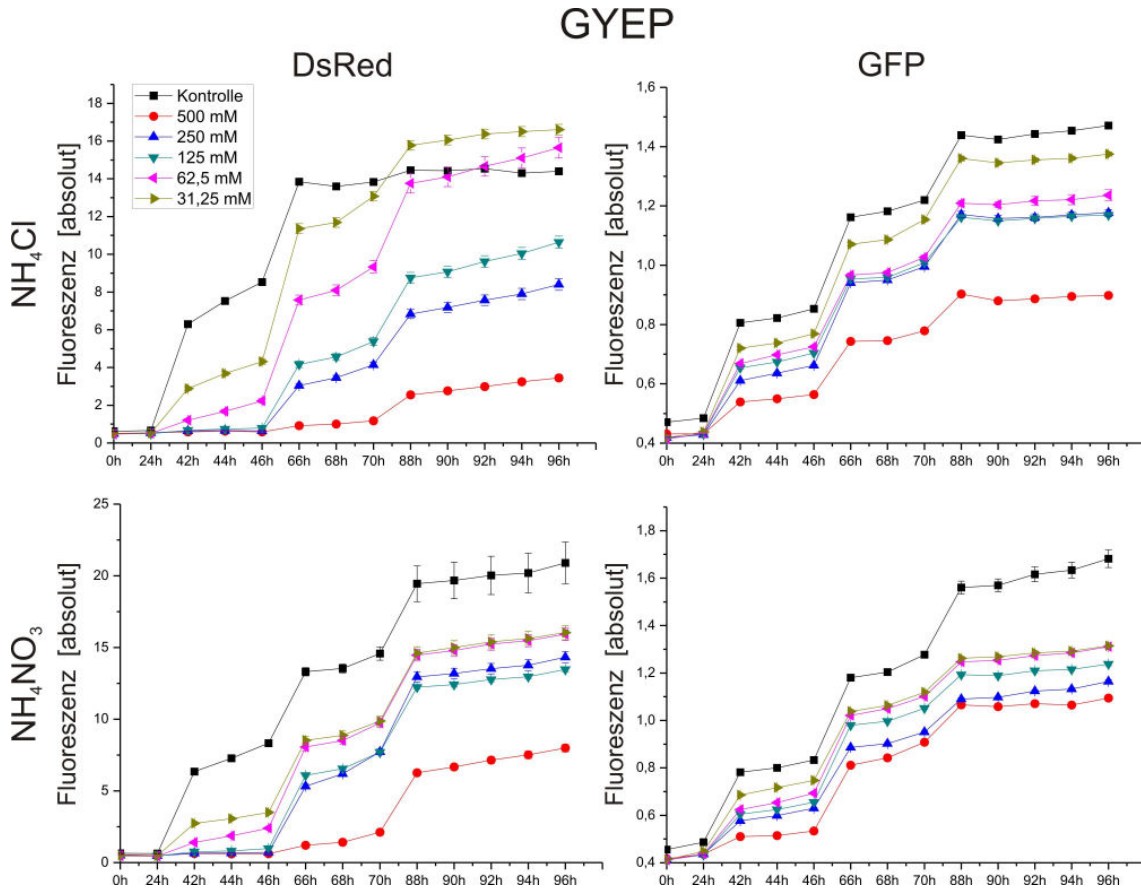


Abbildung 3.15.: Fluoreszenzmessung von Minikulturen in GYEP-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von NH_4Cl und NH_4NO_3 über einen Zeitverlauf von 4 Tagen. Die Graphen zeigen den Mittelwert der unverrechneten Originalwerte aus den Fluoreszenzmessungen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler über 16 Wiederholungen (16 Minikulturen)

weitere Nährstoffe vorhanden (für die Zusammensetzung der Medien siehe 2.4.1 auf S. 12). Auch hier wurden die Originalwerte der Fluoreszenzmessung von DsRed und GFP unverändert aufgetragen um die Entwicklung und die Zunahme der Fluoreszenz und auch das Verhältnis der einzelnen Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen über die Zeit besser herauszustellen. Die Kontrolle bestand hier aus Kompletmedium ohne Zusätze. Im Vergleich zu dem Verlauf der DsRed-Fluoreszenz in Minimalmedium (Abb. 3.13) zeigt sich im Kompletmedium bereits zwischen 24 h und 48 h eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz, die am Ende der Messung nach 96 h fast das 10fache der Fluoreszenz in Minimalmedium beträgt. Auffällig ist hier jedoch, dass die DsRed-Fluoreszenz hier zwischen 46 h und 66 h ein Plateau erreicht, das bis zum Ende der Messreihe langsam wieder abnimmt. Im Vergleich der Fluoreszenzverläufe zwischen Medium mit NH_4Cl und

3. Ergebnisse

Medium mit NH_4NO_3 fallen keine großen Unterschiede auf. Allerdings ist herauszuheben, dass bei beiden Chemikalien die mittleren Konzentrationen von 250 und 125 mM einen ähnlichen Verlauf zeigen wie die Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigen die hohe Konzentration (500 mM) und die niedrigeren Konzentrationen (62,5 und 31,25 mM) eine deutlich geringere Fluoreszenz als die Kontrolle. Auch in den GFP-Fluoreszenzen gibt es keine großen Unterschiede zwischen den getesteten Komponenten und ihren einzelnen Konzentrationen. Auffällig ist jedoch auch hier, dass die mittleren Konzentrationen eine Kurve aufweisen, die dem Verlauf der Kontrolle ähneln, während die höheren und niedrigeren Konzentrationen wieder deutlich geringere Fluoreszenzwerte als die Kontrolle ausweisen. Bei diesem Medium muss auch erwähnt werden, dass es sowohl in der DsRed-Fluoreszenz als auch in der GFP-Fluoreszenz eine deutliche Autofluoreszenz zeigt und somit die Fluoreszenzlevel bereits am Anfang der Messung höher liegen als im Minimalmedium (vergleiche Abb. 3.13).

Die Graphen in Abb. 3.15 zeigen die Zunahme der DsRed- und GFP-Fluoreszenzwerte in GYEP-Medium (Glucose/Yeast Extract/Peptone-Medium) über eine Zeit von 96 h unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat, wobei das GYEP-Medium als Kontrolle diente. Auch in diesem Medium zeigt sich eine Zunahme der DsRed-Fluoreszenz und damit des Myzelwachstums bereits nach 24 h Inkubation. Ähnlich wie im Kompletmedium (Abb. 3.14) zeigen auch in GYEP die Kulturen mit zugefügtem NH_4Cl und NH_4NO_3 eine deutliche Wachstumsinhibierung, die in der 500 mM Konzentration am Stärksten ist. Mit abnehmender Konzentration nähern sich die Fluoreszenzwerte von DsRed immer mehr der Kontrolle an und zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Myzelwachstums. Auch die GFP-Fluoreszenzwerte der getesteten Konzentrationen zeigen einen ähnlichen, jedoch niedrigeren Verlauf wie die der Kontrolle. Ebenso wie in der Messung der DsRed-Werte zeigt die höchste Konzentration an NH_4Cl oder NH_4NO_3 die niedrigste Fluoreszenz, während mit abnehmender Konzentration auch die GFP-Fluoreszenz wieder zunimmt. Das Fluoreszenzlevel der Kontrolle wird jedoch nicht erreicht. Ebenso wie im Kompletmedium muss hier darauf hingewiesen werden, dass das GYEP-Medium an sich bereits eine hohe Autofluoreszenz in den Anregungswellenlängen von DsRed und GFP zeigt. Wie wichtig eine zusätzliche optische Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop ist, zeigt sich besonders in den Kulturen in GYEP-Medium. Obwohl in den Messungen keine GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte (d.h. alle Werte liegen unterhalb denen der Kontrolle), zeigte sich eine Induktion des *TRI5*-Promotor-GFP-Konstruktes bei 500 mM bis 250 mM. Diese Fluoreszenz war jedoch nicht gleichmäßig über die gesamte Minikultur verteilt, sondern betraf nur einige zusammenhängende Myzelfäden in der Kultur (vergleiche dazu Abb. 3.5 b). Neben den

3. Ergebnisse

beschriebenen Salzen wurden auch verschiedene Phenylpropanoidsäuren (siehe Tabelle 2.1 auf S. 32), einschließlich *p*-Cumarinsäure, auf ihre induktiven Eigenschaften hin untersucht. Dazu wurden Endkonzentrationen von 5 mM bis 0,0625 mM eingestellt und auf die Induktion der GFP-Fluoreszenz getestet. Keine dieser Substanzen zeigte eine Induktion der Trichothecenbiosynthese unter den getesteten Bedingungen. Höhere Konzentrationen inhibierten jedoch stark das Myzelwachstum in den Kulturen. Ebenso verhielt es sich mit den getesteten Konzentrationen von H₂O₂ und Menadion (nicht gezeigt).

3.3.1. Trichotheceninduktion durch pflanzliche Extrakte

Trichotheceninduktion auf der Pflanze

In den *in vitro*-Versuchen in 96-Lochplatten konnte die generelle Induzierbarkeit von *TRI5* nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 3.16 ersichtlich, liegt die DON-Konzentration nach fünf Tagen Infektion auf der Weizenähre deutlich über den Werten, die in induzierten Pilzkulturen gemessen werden konnte (vergleiche hierzu Abb. 3.6).

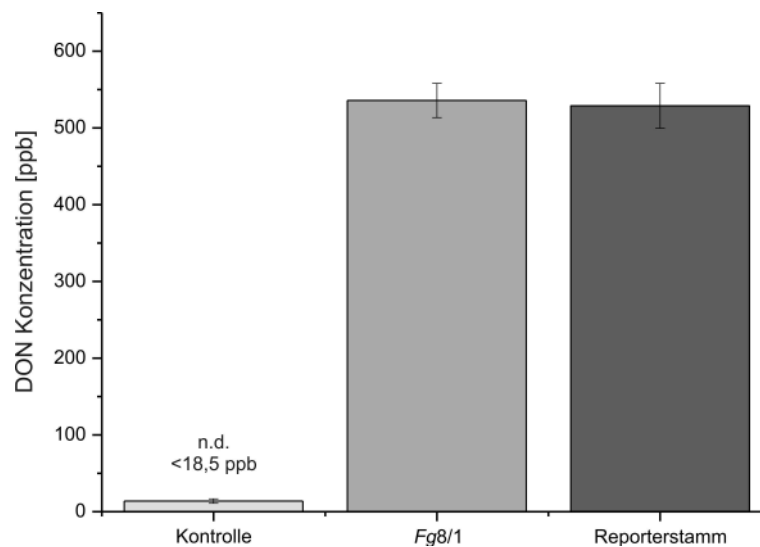


Abbildung 3.16.: Messung der DON-Konzentration in infiziertem Weizengewebe, cv. *Nandu*. Es wurden Weizenähren zum Zeitpunkt der Anthese mit Konidien des *F. graminearum* WT (Fg 8/1) und des Reporterstammes infiziert und nach fünf Tagen geerntet. Als Kontrolle dienten mit Wasser inokulierte Ährchen. Der WT und der GFP-Reporterstamm zeigen eine gleich hohe Konzentration des Mykotoxins nach fünftägigem Wachstum auf der Pflanze.

Hier wurden Weizenpflanzen cv. *Nandu* zum Zeitpunkt der Anthese mit 400 Konidien des WT und *TRI5*Prom::GFP pro Ähre inokuliert. Nach fünf Tagen wurden die inokulierten Ährchen geerntet und die Konzentration von DON mit Hilfe eines ELISA-Tests überprüft. Als Kontrolle dienten Ährchen, die mit Wasser inokuliert wurden. Die Konzentration von DON in dieser Kontrolle lag unter dem Detektionslimit des ELISA-Assays für diese Art von Messung¹. Sowohl die WT-inokulierte Probe als auch die *TRI5*Prom::GFP inokulierte Probe zeigen DON-Werte zwischen 500 und 550 ppb (Abb. 3.16), verglichen mit den etwa 40 ppb DON unter Kulturbedingungen (Abb. 3.6 B).

¹siehe dazu Herstellerangaben für den ELISA-Test RIDASCREEN® DON der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland)

3. Ergebnisse

In vitro-GFP-Induktion durch isoliertes Pflanzengewebe

Um mögliche Komponenten zu identifizieren, die an der sehr viel höheren Induktion der Trichothecenbiosynthese beteiligt sein könnten, wurde versucht die *in vivo* nachgewiesene Induktion mit pflanzlichen Extrakten *in vitro* zu reproduzieren. Dazu wurden, wie bereits beschrieben, Ährchen des Weizenkultivars *Nandu* mit *F. graminearum* inokuliert und nach fünf Tagen der Infektion abgeerntet. Dabei wurden die Rachiselemente, der Teil der Rachis mit dem Rachisknoten, isoliert, getrocknet, gemörsert und das feine Pflanzenmaterial mit Wasser aufgeschlämmt („Rachisel. inf“). Als Kontrolle dienten Ährchen, die mit Wasser inokuliert wurden („Rachisel.“). Der Überstand dieser Suspension und auch die aufgeschlämmte Wasser-Zellwand-Suspension wurden in Minikulturen in 96-Lochplatten eingesetzt.

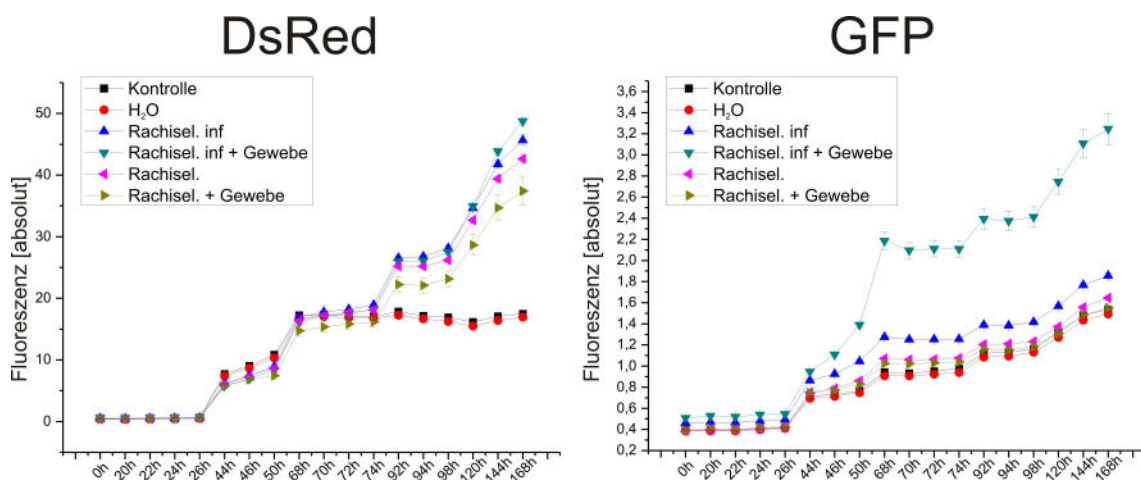


Abbildung 3.17.: Fluoreszenzmessung von Extrakten aus H₂O- und *Fg* 8/1-infizierter Rachis in GYEP über einen Zeitraum von sieben Tagen. Die Kontrolle bestand aus dem Medium ohne Zusatz. Der Graph „H₂O“ zeigt die Fluoreszenzwerte der Minikulturen die in GYEP angezogen wurden, das mit dem gleichen Probenvolumen an Wasser versetzt wurde. Die Graphen „Rachisel. inf“ und „Rachisel.“ zeigen die Fluoreszenzwerte der Minikulturen, die mit dem Überstand des aufgeschlämmten Materials versetzt wurden. Die Graphen „Rachisel. inf + Gewebe“ und „Rachisel. + Gewebe“ zeigen die Fluoreszenzwerte der Minikulturen, die mit dem aufgeschlämmten Pflanzenmaterial versetzt wurden. Dabei wurden neben den löslichen Bestandteilen auch Zellwandbruchstücke in die Kulturen eingebracht. Die DsRed-Fluoreszenzwerte liegen in allen Kulturen mit Pflanzenmaterial dicht zusammen und deuten auf ein verstärktes Wachstum gegenüber der Kontrolle hin. Einzig die Kulturen mit Pflanzenmaterial und Überstand der infizierten Rachiselemente zeigen eine erhöhte GFP-Fluoreszenz. Die Graphen zeigen die unverrechneten Originalwerte der Fluoreszenzmessungen, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler über 16 Wiederholungen (16 Minikulturen).

Dabei zeigte sich, dass auch mit diesem Material eine Induktion der Trichothecenbiosynthese möglich ist. In Abbildung 3.17 ist der Verlauf der DsRed- und GFP-Fluoreszenzen von Minikulturen in GYEP mit dem Zusatz von Rohextrakten aus WT infizierten und

3. Ergebnisse

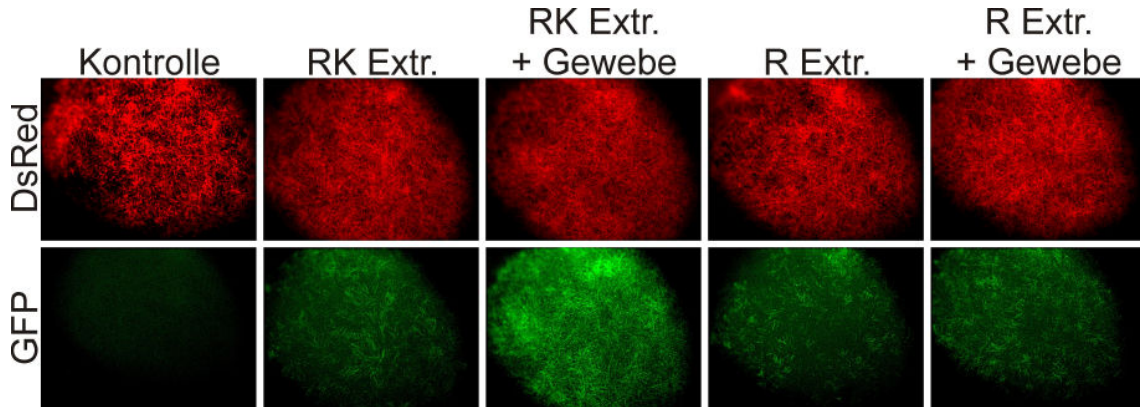


Abbildung 3.18.: Fluoreszenzbilder von Minikulturen in GYEP mit H₂O-Extrakten aus getrennt isolierten Rachisknoten und Rachis, 48 h. Die DsRed-Fluoreszenz der Proben mit den Extrakten aus dem Rachisknoten (RK Extr., RK Extr. + Gewebe) und der Rachis (R Extr., R Extr. + Gewebe) ist annähernd uniform und zeigt ein gleichmäßiges Myzelwachstum innerhalb der Kavität. Alle Kulturen die mit dem aufbereiteten Pflanzenmaterial versetzt wurden zeigen bereits eine deutliche GFP-Induktion nach zwei Tagen. Die Kulturen mit den aufgeschlammten Zellwandbestandteilen des Rachisknotens (RK Extr. + Gewebe) zeigen im Vergleich die höchste GFP-Fluoreszenz. Die Kontrolle zeigt die Fluoreszenz der Kultur in GYEP ohne Zusätze.

H₂O inokulierten Weizenährchen über einen Zeitraum von sieben Tagen dargestellt. Die Kurven der Kontrolle (pures Medium) und der Wasserkontrolle (gleiches Volumen Wasser wie Volumen Extrakt) erreichen zwischen 48 und 72 h ein Plateau der DsRed-Fluoreszenz, welches auf eine Etablierung einer uniformen Myzelkultur hindeutet. Im Gegensatz zu den Kontrollen zeigen die Kulturen mit zusätzlichen Extrakten aus den Weizenähren ein zunehmende Fluoreszenz und damit des Wachstums bis zum Ende der Messreihe. Dabei zeigt sich in der DsRed-Fluoreszenz kein Unterschied zwischen infiziertem und nicht infiziertem Material oder zwischen dem Überstand und der aufgeschlammten Probe. Die Messungen der GFP-Fluoreszenz zeigen im Gegensatz dazu einen deutlichen Unterschied zwischen dem bereits infizierten und nicht infizierten Pflanzenmaterial. Nach 26 h zeigt sich eine starke Zunahme der GFP-Fluoreszenz in den Kulturen mit einem Zusatz aus infiziertem und aufgeschlammten Pflanzenmaterial („Rachisel. inf + Gewebe“). Die Kulturen, die mit dem Überstand dieses Extraktes versehen wurden, zeigen ebenfalls höhere GFP-Werte als die Kontrolle. Das nicht infizierte Pflanzenmaterial scheint keinen Einfluss auf die GFP-Induktion zu haben: Die GFP-Werte dieser Kulturen liegen alle im Bereich der Kontrollen.

Da in den vorangegangenen mikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Induktion des *TRI5*Promotor-GFP-Konstruktes innerhalb des Rachisknotens am Höchsten ist, wurde dieser Bereich sowie die angrenzende Rachis getrennt voneinander aus den infizierten Ährchen präpariert und ebenso, wie bereits beschrieben, in dem Induktions-

3. Ergebnisse

Assay eingesetzt. Die Abbildung 3.18 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kulturen in GYEP nach 48 h Wachstum, die mit Extrakten aus dem infizierten Rachisknoten (RK Extr.) und der Rachis (R Extr.) induziert wurden. Die DsRed-Aufnahmen zeigen ein einheitliches Wachstum in allen Kulturen, unabhängig von dem Extrakt (RK, R) oder dem zusätzlich eingebrachten Zellwandmaterial (+Gewebe). Unter GFP-anregenden Bedingungen zeigt sich dagegen, dass diese Kulturen eine deutliche Induktion der GFP-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle (GYEP-Medium) aufweisen. Die Kulturen mit aufgeschlammtem Zellwandmaterial aus infizierten Rachisknoten (RK Extr.+Gewebe) zeigen jedoch die höchste Induktion des *TRI5*Promotor-GFP-Fusionskonstruktes. Diese Resultate spiegeln die zuvor beschriebenen Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit infizierten Weizenähren wieder. Auch hier zeigte sich eine deutlich höhere Induktion der Trichothecenbiosynthese im Bereich des Rachisknotens als in der Rachis (siehe Abschn. 3.2.1, S. 49; sowie Abb. 3.10, S. 54 und Abb. 3.12, S. 56). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass diese Proben bereits zwischen 24 und 48 h nach Inokulation eine deutliche GFP-Induktion aufweisen.

3.3.2. HPLC/MS Analysen von infizierten Weizenähren

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, war es möglich eine *in vitro*-Kultur mit Rohextrakten aus infizierten Weizenähren zu induzieren (siehe Abschn. 3.3.1 auf S. 63). Um die Komponenten näher zu charakterisieren, die für diese Induktion der Trichothecenbiosynthese verantwortlich sind, wurden Weizenähren mit *F. graminearum* infiziert und die kolonisierten Ährchen nach fünf Tagen abgeerntet. Wasserinokulierte Ähren dienten als Kontrolle. Da sich in den histologischen Untersuchungen (Abschn. 3.2.1) herausstellte, dass im Rachisknoten eine sehr hohe *TRI5*-Induktion stattfindet, wurde dieser zusammen mit einem Teil der Rachis abpräpariert und diente als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Extrakten.

Diese Extrakte wurden in einer HPLC/MS auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Abbildung 3.19 zeigt die UV-Chromatogramme bei 300 nm der EtOH-Extrakte aus den Kontrollproben (3.19 A, „Kontrolle“) sowie aus dem infizierten Gewebe (3.19 B, „infiziert“). Im Vergleich beider HPLC-Läufe fallen in dem Lauf der „infizierten“ Probe einige deutliche Peaks ins Auge, die in der Kontrolle nicht erscheinen, oder deren Intensität sehr viel geringer ausfällt. Zwei dieser Peaks der Retentionszeiten (Rt) 5,927 und 6,785 sind in Abb. 3.19 mit grauen Balken hinterlegt und mit I und II gekennzeichnet. Das extrahierte Ionenchromatogramm für die RT = 5,927 wird in Abbildung 3.20 gezeigt. Dabei zeigt 3.20 A die Ionenspur in der Kontrolle und 3.20 B die Spur des Extraktes aus der „infizierten“ Probe. Bei der korrelierenden Zeit zeigt sich in der Kontrolle nur

3. Ergebnisse

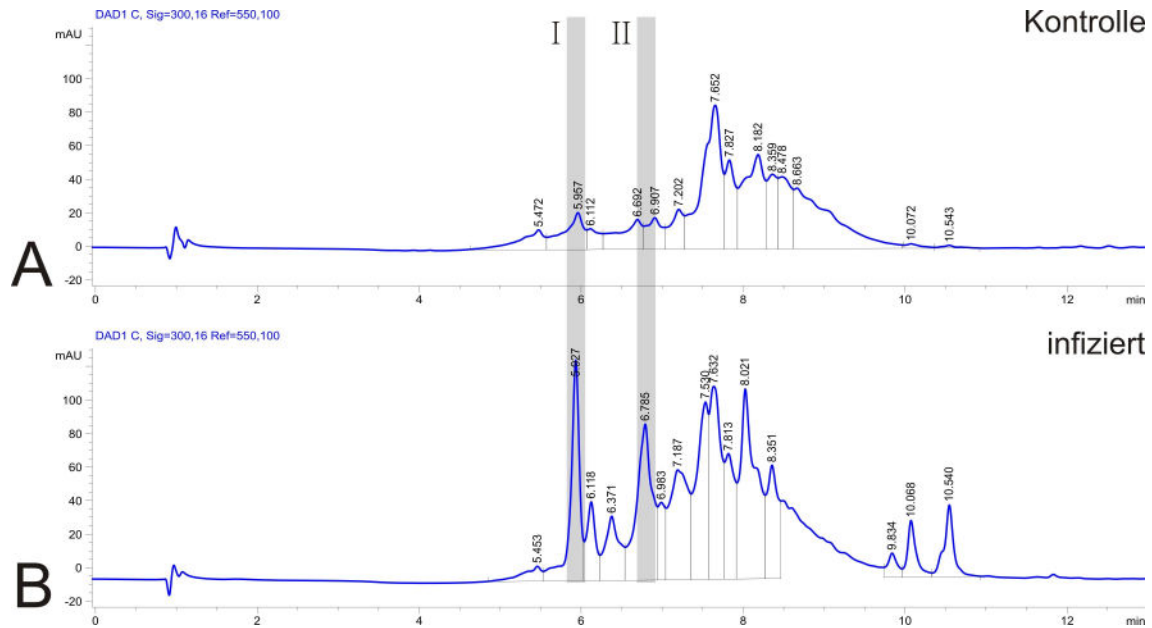


Abbildung 3.19.: UV-Chromatogramme bei 300 nm des EtOH-Extraktes aus *F. graminearum* und Wasser inokulierten Weizenährchen. **A** UV-Chromatogramme des EtOH-Extraktes aus der Kontrolle (mit H₂O inokuliert). **B** UV-Chromatogramme des EtOH-Extraktes aus dem infizierten Gewebe. Es sind deutliche Unterschiede zwischen beiden Proben in der Anzahl und Höhe der Peaks zu erkennen. Auf die mit grau hinterlegten Peaks (I und II) wird im Text näher eingegangen. Die Zahlen über den einzelnen Peaks geben die individuelle Retentionszeit (Rt) an.

eine geringe Signalstärke während die „infizierte“ Probe ein starkes Signal zeigt. Ein Abgleich mit dem extrahierten Ionenchromatogramm für den, unter gleichen Bedingungen gemessenen, Standard *p*-Cumarinsäure zeigte ebenfalls bei $R_t = 5,927$ einen deutlichen Peak. Eine nähere Untersuchung des Signals bei 3.19 I zeigt im Massenchromatogramm identische Kennlinien zu dem Standard *p*-Cumarinsäure (Abb. 3.21 A, B). Das UV-Spektrum von *p*-Cumarinsäure und dem isolierten Ion bei $R_t = 5,927$ stimmt ebenfalls überein. Dieses Ergebnis zeigt eine deutliche Zunahme der *p*-Cumarinsäure-Konzentration in Weizenähren nach erfolgter Infektion mit *F. graminearum*. Der zweite deutliche Peak 3.19 II konnte leider nicht abschließend aufgeklärt werden. Die zu diesem Peak gehörenden extrahierten Ionenchromatogramme, das UV-Spektrum und das Massenchromatogramm sind im Anhang in Abbildung A.4 (S. 148) gezeigt.

Zusätzlich zu den Peaks im UV-Spektrum zeigten sich auch Signale in den Massenchromatogrammen, die jedoch keinerlei oder nur eine geringe Absorption im UV-Spektrum aufwiesen. Im Anhang zeigt Abbildung A.5 (S. 149) die Massenspektren der EtOH-Extrakte aus dem Kontrollmaterial (**A**) und aus der „infizierten“ Probe (**B**). In den isolierten Ionenspuren (**C** und **D**) für die einzelnen Peaks zeigt sich auch hier eine deutli-

3. Ergebnisse

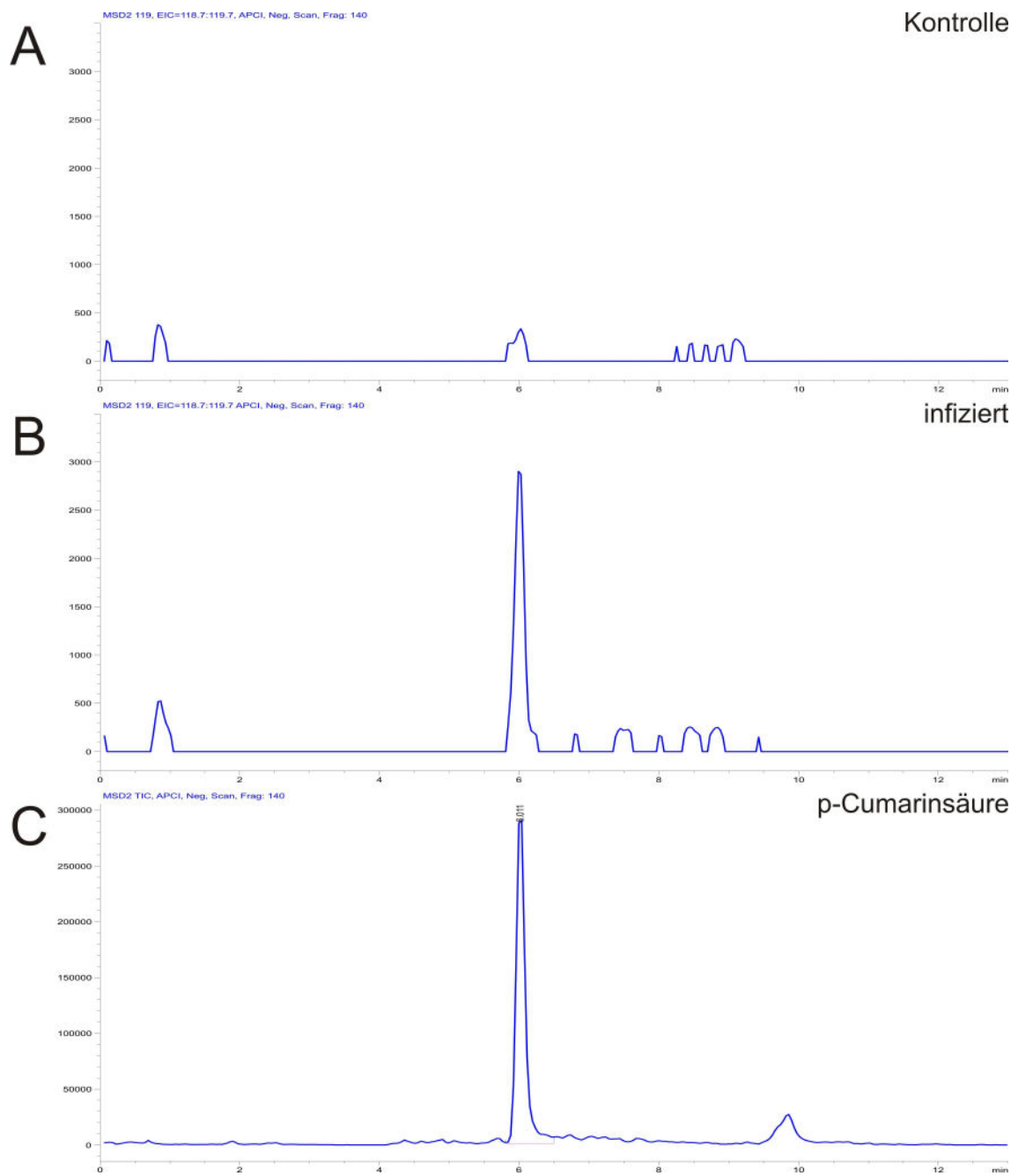


Abbildung 3.20.: Extrahierte Ionenchromatogramme für die isolierte Masse von 119 m/z korrelierend für *p*-Cumarinsäure, Vergleich zwischen der infizierten Probe und der Kontrolle. **A** Isoliertes Ionenchromatogramm der Kontrolle. **B** Isoliertes Ionenchromatogramm der infizierten Probe. **C** Isoliertes Ionenchromatogramm für den Standard *p*-Cumarinsäure. Die Retentionszeit ($R_t = 5,927$) des Peaks aus dem Extrakt der infizierten Weizenähren stimmt überein mit dem der *p*-Cumarinsäure.

3. Ergebnisse

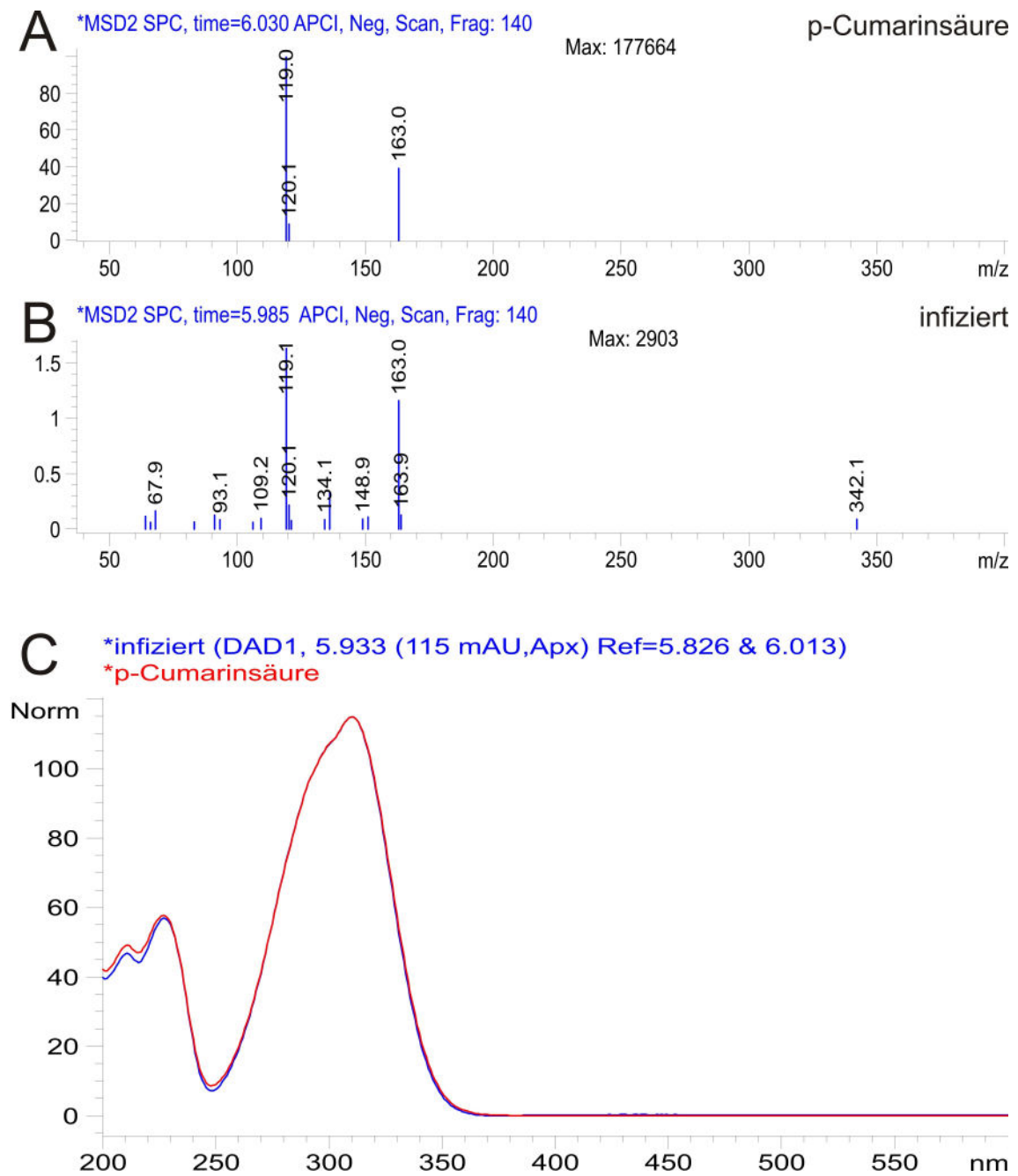


Abbildung 3.21.: Massenspektren von Rt 5,927 (I) und *p*-Cumarinsäure, sowie deren UV-Spektren im direkten Vergleich. Die Peaks des Massenspektrums von *p*-Cumarinsäure (**A**) zeigen sich auch in dem Massenspektrum der Probe aus dem infizierten Weizengewebe (**B**). **C** Die UV-Chromatogramme von *p*-Cumarinsäure und dem isolierten Peak bei Rt 5, 927 sind nahezu identisch. Die Zahlen über den Peaks geben die Masse der jeweiligen Komponente an.

3. Ergebnisse

che Zunahme der Signalstärke bei der Probe aus infiziertem Pflanzenmaterial. Abgesehen von der identifizierten *p*-Cumarinsäure ließen sich keine weiteren Verbindungen eindeutig identifizieren.

3.3.3. Isolierung alkoholischer Extrakte aus Weizen- und Maiskörnern

Neben den Problemen, die eine Fusariuminfektion auf der Weizenpflanze verursacht, kann es auch während der Lagerung von bereits abgeernteten Körnern zu einer vermehrten Toxinproduktion kommen. Die möglichen Faktoren für diese Induktion der Trichothecenbiosynthese müssen also im gereiften Korn zu finden sein. Um diese möglichen Faktoren zu identifizieren, wurden Rohextrakte aus Weizen- und Maismehl hergestellt. Die Isolierung erfolgte mit alkoholischen Lösungen und die Extrakte wurden in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingedampft. Die trockenen Rückstände wurden mit dem Extraktionslösungsmittel in einer Konzentration von 50 mg/mL aufgenommen und anschließend in unterschiedlichen Endkonzentrationen in den Induktionsassays eingesetzt.

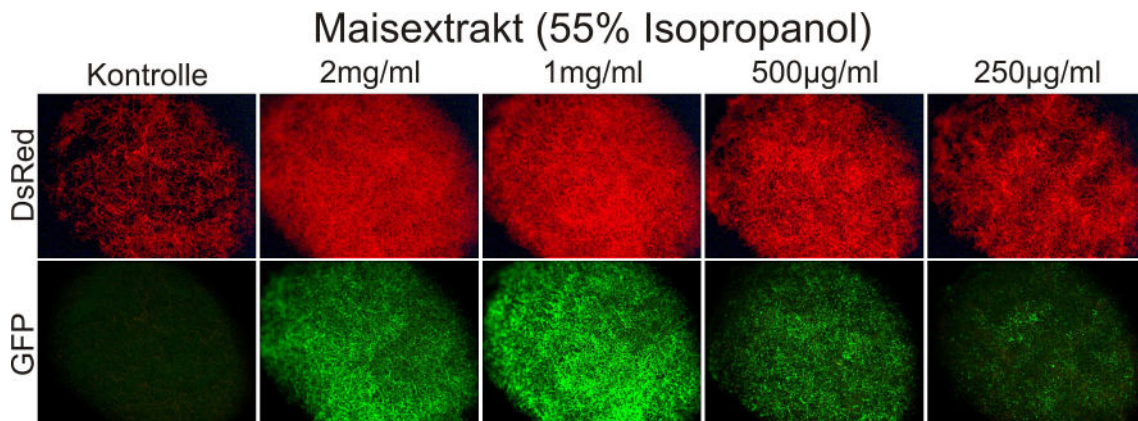


Abbildung 3.22.: Fluoreszenzbilder von Minikulturen in GYEP mit Maisextrakt (55% Isopropanol) in unterschiedlichen Endkonzentrationen nach 48 h. Der Maisextrakt wurde vor dem Beladen der Vertiefungen mit Medium in die einzelnen Kavitäten eingebracht und das Lösungsmittel vollständig verdampft.

In Abbildung 3.22 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Minikulturen eines Induktionsassays gezeigt. Hier wurde GYEP-Medium mit einer absteigenden Endkonzentration von Maisextrakt (55% Isopropanol) kombiniert und bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Bereits nach 48 h Inkubation zeigte sich bei allen Konzentrationen eine starke GFP-Fluoreszenz, die innerhalb der einzelnen Minikulturen gleichmässig über das gesamte Myzel verteilt war. Es zeigt sich auch ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Induktion des Reporterstammes: Mit abnehmender Endkonzentration des Extraktes sinkt auch die Intensität der GFP-Fluoreszenz. Im Vergleich zur Kontrolle fällt auch

3. Ergebnisse

auf, dass die Kulturen mit Maisextrakt ein besseres Wachstum aufweisen. Dies liegt wahrscheinlich an einem zusätzlichen Nährstoffangebot durch die Zugabe des Maisextraktes. Die Zusammensetzung der Rohextrakte wurde nicht vollständig bestimmt. Durch die verwendete Isolierungsmethode werden vor allem in alkoholischen Lösungen lösliche Speicherproteine aus dem Weizen- und Maismehl extrahiert. Um dies zu zeigen, wurden die Speicherproteine aus Mais und Weizen mit angepassten Extraktionspuffern spezifisch extrahiert und auf einem Acrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt (siehe Material und Methoden, Abschn. 2.9.4, S. 36).

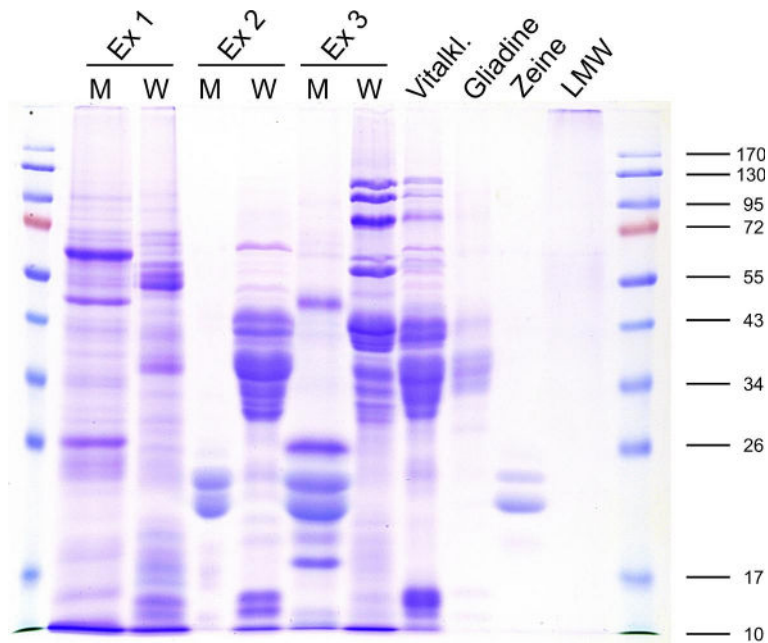


Abbildung 3.23.: SDS-PAGE isolierter Speicherproteine aus Weizen und Mais. Dazu wurden mit verschiedenen Extraktionspuffern (Ex 1-3, siehe dazu 2.9.4 auf S. 36) die unterschiedlichen Speicherproteine aus Weizen- (W) und Maismehl (M) isoliert und nebeneinander aufgetragen. Albumin/Globulin Fraktion (Ex 1), Gliadinfraktion (Ex 2), Gluteninfraktion (Ex 3). Zusätzlich zu den selbstisolierten Speicherproteinen wurde eine Probe des Vitalklebers (Vitalkl.) EMCEvit C sowie HPLC-gereinigte Fraktionen der Gliadine und LMWs (Low Molecular Weight) aus Weizen und der Zeine aus Mais aufgetragen. Die HPLC-gereinigten Fraktionen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Peter Köhler (DFA Lebensmittelchemie, TU München) zur Verfügung gestellt. Als Proteinmarker wurde der „peqGOLD Prestained Protein-Marker IV“ der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland) verwendet, der in der linken und rechten Außenspalte zu sehen ist. Auf der rechten Seite sind die Molekularmassen der einzelnen Banden des Proteinmarkers in kDa angegeben.

Die unterschiedlichen Speicherproteine einer solchen Isolation sind in Abbildung 3.23 nach einer SDS-PAGE dargestellt (Ex 1-3). Die ersten beiden Spuren von links zeigen die isolierte Albumin/Globulin Fraktion (Ex 1) aus Maiskörnern (M) und Weizenkörner (W) der Speicherproteine. Die vier darauf folgenden Bahnen zeigen die Speicherproteine

3. Ergebnisse

der Gliadinfraktion (Ex 2) und der Gluteninfraktion (Ex 3). Bei diesen Speicherproteinfraktionen fällt auf, dass sich die Gliadine des Mais (Zeine genannt) deutlich in der Proteingröße von den Gliadinen und Gluteninen des Weizens unterscheiden. Der aufgetragene Vitalkleber EMCEvit C (Vitakl., Mühlenchemie GmbH & Co. KG, Ahrensburg, Deutschland) ist ein kommerziell erhältlicher Zusatzstoff für Backmischungen und enthält im Wesentlichen den gereinigten Gliadinanteil des Weizenmehls. Neben dieser Spur wurden HPLC-aufgereinigte Zeine, Gliadine und LMW Gliadine („Low Molecular Weight“) aufgetragen, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Peter Köhler (DFA Lebensmittelchemie, TU München) zur Verfügung gestellt wurden. Diese hochreinen Speicherproteinfraktionen ließen sich leider nicht gut auftrennen, da sie bereits im Proteinladepuffer wieder ausfielen und ein Großteil der Proteinbeladung somit im Sammelgel zurückgehalten wurde. Die Extraktionen der Speicherproteine für die Induktionsassays wurden mit reinen alkoholischen Lösungen durchgeführt, um eine Verunreinigung der Extrakte durch Zusätze wie Dithiothreitol und Harnstoff zu vermeiden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die auf diese Weise gewonnenen Extrakte, neben den Speicherproteinen, auch lösliche Zucker enthalten, die ebenfalls einen Effekt auf die Induktion der Trichothecenbiosynthese haben können. Aus diesem Grund wurden weitere Induktionsassays durchgeführt, bei denen als Medium MM_{mod} eingesetzt wurde. Als Induktor wurde die kommerziell erwerbliche, reine Proteinfraktion EMCEvit C aus Weizen (Gluteninfraktion) eingesetzt, um einen weiteren Eintrag von Zuckern zu verhindern. Des Weiteren wurden verschiedene Zucker als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Die Abbildung und Beschreibung dieser Tests befinden sich in Abschnitt 3.5 auf Seite 79.

Durch die durchgeführte Extraktionsmethode wurden vorwiegend Speicherproteine aus Weizen- und Maismehl isoliert und anschließend in den Induktionstests eingesetzt sowie mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Diese Extrakte führten zu einer sehr starken GFP-Fluoreszenz. Dies weist damit auf eine hohe Expression der Gene des Trichothecen-Genclusters hin. Versuche mit einer reinen Gluteninfraktion aus Weizen (EMCEvit C, Vitalkleber) und unterschiedlichen Zuckern in einem definierten Medium zeigen neben der *TRI5*-induzierenden Wirkung der Speicherproteine auch einen Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Expression von *TRI5* (siehe Ergebnisse in Abschn. 3.5, Abb. 3.31)

3.4. Wachstum auf Agarplatten unterschiedlicher Medien

Die Induzierbarkeit von *TRI5* durch die Zugabe von AS sowie durch die Glutamin-reichen Speicherproteine aus Weizen und Mais erbrachte den Hinweis einer möglichen stickstoff-abhängigen Regulation der Trichothecenbiosynthese. Um diesem Hinweis nachzugehen, wurden Pilzkolonien auf Agarplatten angezogen und auf ihren Wachstumsphänotyp als auch auf die Induktion von *TRI5* getestet. Diese Tests wurden auf modifiziertem Minimalmedium ($MM_{mod.}$) ausgeführt, da hier die kontrollierte Zugabe von verschiedenen Stickstoffverbindungen einfach erfolgen konnte. Zudem wurde bei der Herstellung der Medien die Zucker variiert, um einen eventuellen Einfluss der Kohlenstoffquelle bestimmen zu können.

Auf den Minimalmediumplatten mit $CaNO_3$ als Stickstoffquelle wächst das Myzel sehr schnell und mit wenigen Verzweigungen. Bereits nach 4-5 Tagen hat die Pilzkolonie den gesamten Radius der Platte bewachsen. Der Wachstumsphänotyp unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den unterschiedlichen Calciumnitratkonzentrationen, einzig bei den niedrigsten Konzentrationen (62,5 und 31,25 μM) ist das Myzel nicht so dicht gewachsen wie bei den höheren Konzentrationen (Abb. 3.24). Neben dem linearen Wachstum zeigt *F. graminearum* hier auch eine vermehrte Konidienproduktion, die in den stark roten Bereichen in der Mitte der Platten stattfindet. Die Färbung der Pilzkolonien ist ebenfalls sehr einheitlich und weist auf eine vermehrte Produktion des roten Pigments Aurofusarin hin. Jedoch fällt auf, dass mit zunehmender $CaNO_3$ -Konzentration der Bereich der Rotfärbung auf die Mitte der Platte und damit auf das ältere Myzel beschränkt bleibt. Dies trifft für die Agarplatten mit Saccharose und Glucose als Kohlenstoffquelle, allerdings nicht für die Agarplatten mit Fructose zu. Hier zeigt sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der Pigmentproduktion über die gesamte Fläche der Petrischale (Abb. 3.24). Auf Agarplatten mit Minimalmedium und $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle zeigt sich ein vollkommen anderes Bild. Die Kulturen zeigen ein sehr stark verzweigtes Myzelwachstum und somit kaum radiäres Längenwachstum. Bereits bei der niedrigsten Konzentration von 31,25 μM AS zeigt sich im Vergleich zu den Nitratplatten ein deutlich eingeschränktes Hyphenwachstum (vergleiche Abb. 3.24, Abb. 3.25). Die Hyphen verzweigen sich sehr stark und bewirken, von der Verzweigungsstelle ausgehend, ein fächerförmiges Wachstum. Dieser Phänotyp wird mit zunehmender Ammoniumsulfatkonzentration immer ausgeprägter, so dass bei der höchsten Konzentration von 5 mM AS kaum mehr Längenwachstum zu beobachten ist (Abb. 3.25, 3.27). Während die Änderung des Myzelwachstums auf den Agarplatten mit Saccharose und Glucose von der steigenden Ammoniumsulfatkonzentration abhängt, zeigt *F. graminearum* auf Fructose bereits bei 1,25 mM AS ein stark vermindertes

3. Ergebnisse

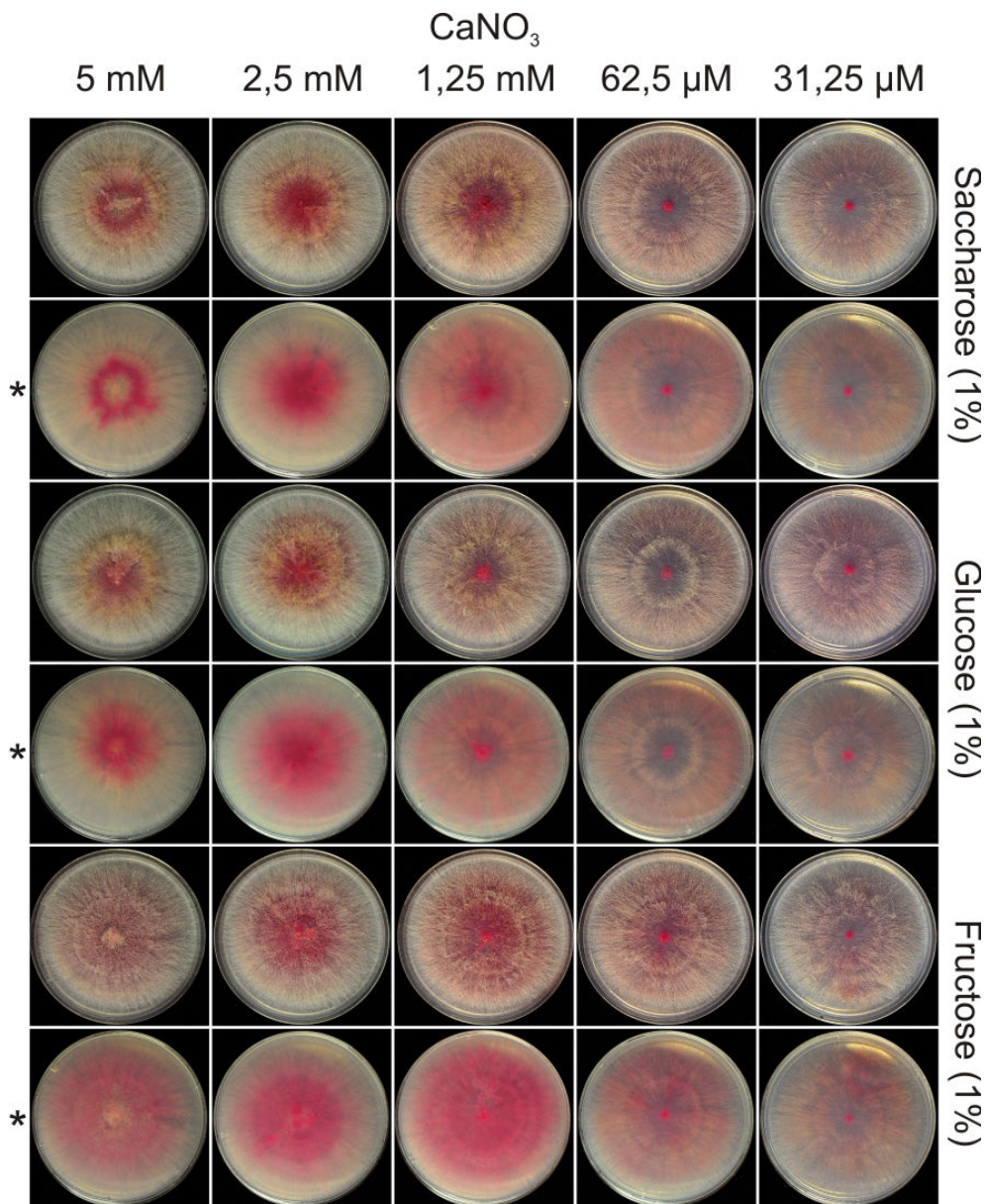


Abbildung 3.24.: Phänotyp von *F. graminearum* auf MM_{mod.}-Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und CaNO₃ als N-Quelle, 5 dpi. CaNO₃ als einzige Stickstoffquelle bewirkt ein radiäres und langgestrecktes Hyphenwachstum. Das Myzel ist sehr dünn, zeigt ein lineares Längenwachstum und eine Ausprägung von Luftmyzel. Es gibt kaum Unterschiede im Wachstumsphänotyp zwischen den verschiedenen CaNO₃-Konzentrationen. Der Wachstumsphänotyp der Platte mit der geringsten Konzentration gleicht dem Phänotyp bei der höchsten Konzentration, abgesehen von der Dichte des Myzels. Ebenso scheint es keinen Wachstumsunterschied auf den unterschiedlich angebotenen Kohlenstoffquellen zu geben. Die Färbung der Kolonien zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Reihen mit einem Stern markiert zeigen die Unterseiten der Agarplatten.

3. Ergebnisse

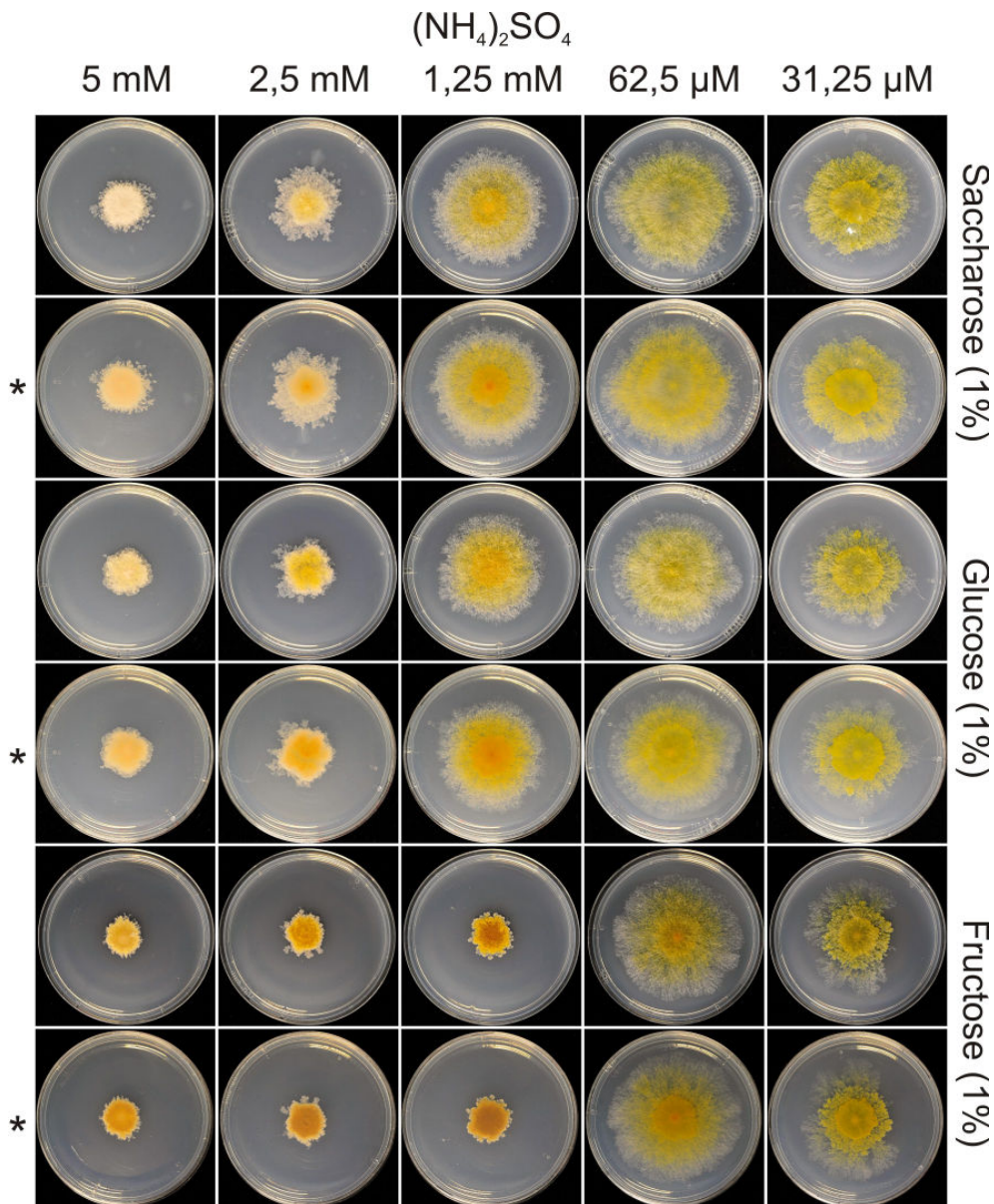


Abbildung 3.25.: Phänotyp von *F. graminearum* auf $\text{MM}_{mod.}$ -Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-Quelle, 5 dpi. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als einzige Stickstoffquelle zeigt einen sehr starken Wachstumsphänotyp. Das wachsende Myzel weist viele Verzweigungen auf und ist sehr dicht gepackt. Das Längenwachstum ist deutlich eingeschränkt. Bis zu einer Konzentration von 62,5 μM AS zeigen die Platten bei allen Kohlenstoffquellen den gleichen Phänotyp. Bei 1,25 mM AS zeigt *F. graminearum* bereits ein dramatisch eingeschränktes Längenwachstum auf 1% Fructose. Ab 2,5 mM zeigen alle Kolonien auf allen Kohlenstoffquellen das gleiche Wachstumsverhalten: Deutlich eingeschränktes Längenwachstum und eine starke Verzweigung des Myzels. Dieser Phänotyp wird bei 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ noch verstärkt. Die Färbung der Kolonien ist einheitlich gelblich und zeigt keinerlei Unterschiede zwischen den angebotenen Kohlenstoffquellen. Reihen mit einem Stern markiert zeigen die Unterseiten der Agarplatten.

3. Ergebnisse

Längenwachstum (Abb. 3.25, unten). Die Färbung der Kulturen zeigt ein ähnliches Bild. Mit zunehmender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration nimmt die Gelbfärbung der Kolonien auf den Saccharose- und Glucoseplatten immer mehr ab. Auf den Platten mit AS und Fructose als Kohlenstoffquelle bleibt die Färbung der Kolonie dagegen nahezu gleich und zeigt einen dunkleren Farbton im Vergleich zu den anderen Platten. Da das Wachstum der Kulturen auf MM_{mod} -Agarplatten mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ einen deutlichen Unterschied zu dem Wachstum auf CaNO_3 zeigt, wurde überprüft, ob dieser Unterschied durch das Ammonium oder das Sulfat ausgelöst wird. Dazu wurden neue Agarplatten hergestellt, bei denen als Stickstoffquelle Ammoniumchlorid verwendet wurde. Um äquimolare Mengen an Ammonium im Medium zu gewährleisten, wurden doppelte Mengen an NH_4Cl eingesetzt. Wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist, zeigen die Kolonien auch auf dieser Ammoniumquelle das bereits beschriebene Wachstumsverhalten: Mit zunehmender Konzentration kurze und stark verzweigte Hyphen sowie eine Gelbfärbung des Myzels.

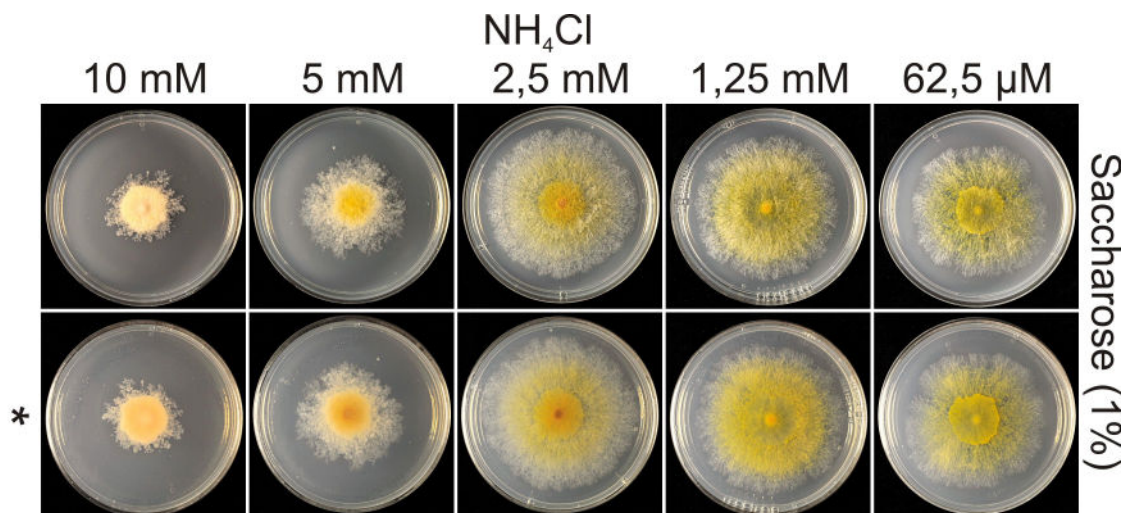


Abbildung 3.26.: Phänotyp von *F. graminearum* auf MM_{mod} -Agarplatten und NH_4Cl als N-Quelle, 5 dpi. Das Wachstum von *F. graminearum* auf NH_4Cl unterscheidet sich nicht von dem auf $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Durch die Verwendung der doppelten Menge an NH_4Cl wurde sichergestellt, dass den Kolonien äquimolare Mengen Ammonium im Vergleich zu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zur Verfügung stehen. Die mit einem Asterik markierte Reihe zeigt die Unterseiten der Agar-Platten.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte auf den MM_{mod} -Agarplatten mit CaNO_3 keine Induktion des *TRI5*-Promotors festgestellt werden. Auf den MM_{mod} -Agarplatten mit Ammoniumsulfat konnte dagegen bereits ab einer Konzentration der zugefügten Stickstoffquelle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von $62,5 \mu\text{M}$ eine Induktion der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden.

Abbildung 3.27 zeigt den Wachstumsphänotyp und die Expression von GFP des Repor-

3. Ergebnisse

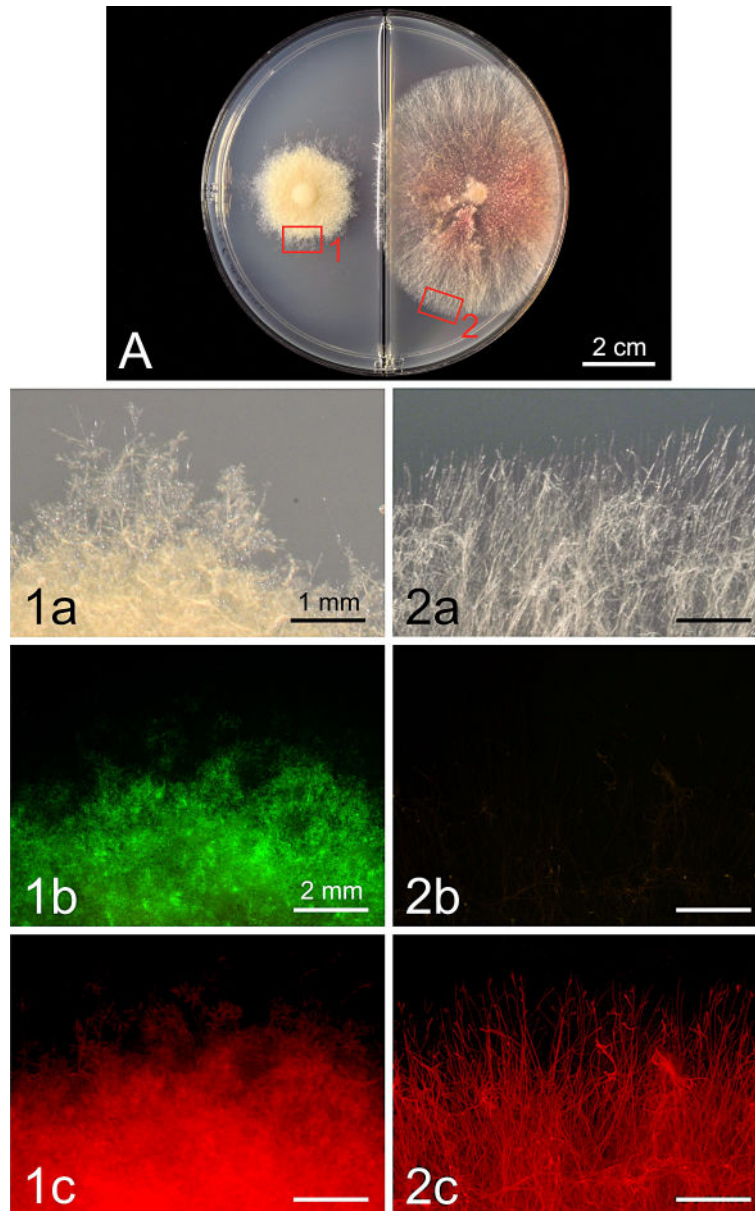


Abbildung 3.27.: Phänotyp des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes auf *MM_{mod.}*-Agar mit Ammonium und Nitrat (je 5 mM) als N-Quelle, 4 dpi. **A** Geteilte Petrischale. Das linke Kompartiment wurde mit *MM_{mod.}* mit 5 mM Ammoniumsulfat (**1**), das rechte Kompartiment mit *MM_{mod.}* mit 5 mM Calciumnitrat (**2**) befüllt. Es zeigt sich der bereits beschriebene Wachstumsphänotyp auf den unterschiedlichen Stickstoffquellen (Abb. 3.24, 3.25). **1a-1c** und **2a-2c** zeigen Vergrößerungen aus **A1** und **A2**. **1a-2a** Weißlichtaufnahmen des Kulturrandes des Myzels auf 5 mM Ammonium bzw. 5 mM Nitrat. Das Myzel auf NH_4^+ zeigt eine sehr starke Verzweigung der Hyphen, das Myzel auf NO_3^- zeigt ein lineares Hyphenwachstum mit wenig Verzweigungen. **1b-2b** GFP-Fluoreszenz des Kulturrandes des Myzels auf 5 mM Ammonium bzw. 5 mM Nitrat. Während auf Ammonium die gesamte Kolonie eine GFP-Induktion zeigt, ist auf dem nitrathaltigen Medium keine GFP-Fluoreszenz zu beobachten. **1c-2c** DsRed-Fluoreszenz des Kulturrandes des Myzels auf 5 mM Ammonium bzw. 5 mM Nitrat. Die DsRed-Fluoreszenz zeigt wie die Weißlichtaufnahmen das sehr stark verzweigte Myzel der Kultur auf Ammonium, während die Hyphen auf Nitrat ein lineares, kaum verzweigtes Längenwachstum aufweisen. Diese Versuche wurden mit 1% Saccharose als Kohlenstoffquelle durchgeführt.

3. Ergebnisse

terstammes auf ammonium- (3.27 A, links) bzw. nitrathaltigem $MM_{mod.}$ (3.27 A, rechts) in direktem Vergleich nach 4 dpi. Hier wurde eine geteilte Petrischale verwendet, die durch einen Steg in zwei Kompartimente geteilt wird. Die Kompartimente wurden jeweils mit $MM_{mod.}$ mit 5 mM AS bzw. mit $MM_{mod.}$ mit 5 mM $CaNO_3$ gefüllt und gleichzeitig mit 1000 Konidien angeimpft. Nach viertägigem Wachstum des Reporterstammes zeigt sich der bereits beschriebene Wachstumsphänotyp auf Ammonium und Nitrat. In den Teilabbildungen 3.27 **1a-2a** sind die Weißlichtaufnahmen des vergrößerten Randes der Pilzkulturen zu sehen. Hier zeigt sich deutlich der Unterschied im Wachstumsverhalten auf den unterschiedlichen Stickstoffquellen. Auf Ammonium (**1a**) zeigt sich ein stark verzweigtes Myzelwachstum, während auf nitrathaltigem Medium (**2a**) ein lineares und wenig verzweigtes Hyphenwachstum zu beobachten ist. Das Gleiche gilt für die DsRed-Fluoreszenzaufnahmen in Teilabbildung **1c** (Ammonium) und **2c** (Nitrat). Unter GFP-anregenden Bedingungen (**1b-2b**) konnte eine Induktion des Reporterstammes nur auf dem ammoniumhaltigen Medium beobachtet werden (**1b**). Im Anhang befindet sich eine weitere Abbildung, die das unterschiedliche Wachstum und die Induktion des Reporterstammes auf Medium mit Ammonium bzw. Nitrat zeigt (siehe Abb. A.6, S. A.6).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Stickstoffquelle einen sehr starken Einfluss auf die Expression von $TRI5Prom::GFP$ und damit auf die Trichothecensynthese ausübt. Während auf nitrathaltigem Medium keine GFP-Fluoreszenz beobachtet wurde, wurde das $TRI5$ -Promotor-GFP-Konstrukt auf ammoniumhaltigem Medium sehr stark aktiviert. Zusätzlich hat Ammonium einen drastischen Effekt auf das Längenwachstum und die Pigmentierung des Pilzes. Ebenfalls konnte geklärt werden, dass diese Ergebnisse tatsächlich auf die Verfügbarkeit von Ammonium zurückgehen und nicht etwa auf den Eintrag von Sulfat ins Medium. Da das Wachstum auf Medium mit NH_4Cl die gleichen Ergebnisse zeigt wie das Wachstum auf Medium mit $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle, ist es eindeutig das Ammonium, welches zu einer Veränderung des Wachstumsphänotyps und der Trichothecensynthese führt.

3.5. Die Kohlenstoffquelle hat einen Einfluss auf die *TRI5*-Induktion

In den vorangegangenen Versuchen zeigte sich neben dem Einfluss von Stickstoff ein deutlicher Unterschied in der Induktion der GFP-Fluoreszenzen zwischen unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Während auf 1% Saccharose bereits bei 62,5 μM AS eine deutliche GFP-Induktion festzustellen war, konnte auf 1% Glucose erst bei 1,25 mM AS GFP-induziertes Myzel dokumentiert werden. Auf der dritten getesteten Zuckerart, Fructose, konnte dagegen bei keiner Ammoniumsulfatkonzentration eine Induktion des Reporterstammes festgestellt werden. Wie in Abbildung 3.28 zu sehen ist, gab es auch deutliche Unterschiede in der Verteilung des induktiven Myzels.

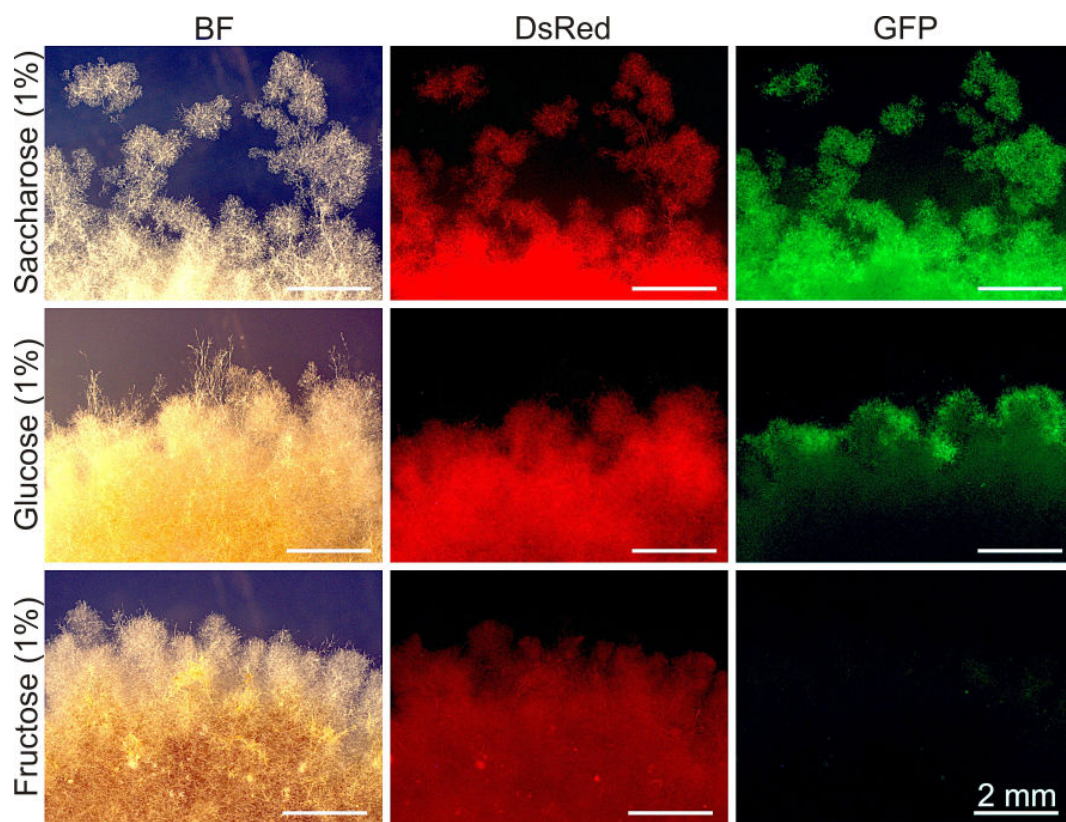


Abbildung 3.28.: *TRI5*-Induktion von *TRI5Prom::GFP* auf *MM_{mod.}*-Agarplatten und 2,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-Quelle, 5 dpi. Die Induktion des GFP-Reporterproteins in den Pilzkulturen auf Saccharose nimmt fast die vollständige Kultur ein, während die Induktion auf Glucose auf den Rand der Kultur beschränkt bleibt. Bei den Kulturen auf Fructose konnte keine Induktion des Reporterstammes festgestellt werden.

Bei einer Konzentration von 2,5 mM AS zeigt sich eine Induktion fast der vollständigen

3. Ergebnisse

Myzelkultur auf Saccharose, während die Induktion der Trichothecenbiosynthese auf Glucose auf den unmittelbaren Rand der Kultur beschränkt bleibt. Die Pilzkulturen auf Fructose dagegen zeigen keinerlei Induktion des *TRI5*-Genclusters. Generell war jedoch auch die DsRed-Fluoreszenz schwächer als in den anderen Kulturen. Um den Einfluss unterschiedlicher Zucker auf die Induktion der Trichothecenbiosynthese zu überprüfen, wurden Minikulturen in flüssigem $MM_{mod.}$, Vitalkleber als Induktor und verschiedenen Zuckern angezogen. Für diesen Versuch wurde eine industriell erhältliche Speicherproteinfraction (Vitalkleber EMCEvit C) verwendet, um eine Einbringung von zusätzlichen Zuckern, wie sie in den manuell erstellten Fraktionen zu erwarten waren, zu vermeiden. In Abbildung 3.31 sind die Fluoreszenzbilder einzelner Minikulturen nach zwei Tagen Wachstum dieser Platten aufgezeigt. Bei allen Kulturen zeigt sich eine Zunahme der DsRed-Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration des Speicherproteins, allerdings wurde auch hier eine geringere DsRed-Fluoreszenz in den Kulturen mit Fructose als Kohlenstoffquelle beobachtet. Die GFP-Fluoreszenzen in den Kulturen mit Saccharose, Glucose und einem Gemisch aus 0,5% Glucose und 0,5% Fructose mit Vitalkleber als Stickstoffquelle zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop kaum Unterschiede in der Intensität. Die Minikultur in $MM_{mod.}$ mit Saccharose zeigt als Einzige bereits bei der geringsten Konzentration von 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Vitalkleber eine Induktion des Myzels.

Die beiden Abbildungen 3.29 und 3.30 zeigen die Fluoreszenzmessungen der Platten, von denen individuelle Minikulturen in Abbildung 3.31 gezeigt sind. Die Kontrolle bestand in diesem Fall aus $MM_{mod.}$ mit unterschiedlichen Zuckern, aber *ohne* die einzige Stickstoffquelle EMCEvit C (Gluteninfraktion der Weizenspeicherproteine). Ohne eine verfügbare Stickstoffquelle kann *F. graminearum* nicht wachsen, weshalb in diesen Kontrollkulturen auch keine Fluoreszenz gemessen werden konnte. Im Allgemeinen zeigt sich ein gleichmäßiger Anstieg der DsRed-Fluoreszenz in den verschiedenen Medien während des Messintervalls von 96 h (siehe Abb. 3.29 und 3.30, **DsRed**). Eine höhere Konzentration an Vitalkleber hat auch eine höhere DsRed-Fluoreszenz zur Folge, was auf ein vermehrtes Myzelwachstum in den Kulturen mit einer größeren Nährstoffverfügbarkeit zurückzuführen ist. Bei der höchsten Konzentration an EMCEvit C (5 mg/mL, schwarze Kurve) liegt das Wachstum (DsRed-Fluoreszenz) in den ersten zwei Tagen hinter dem der niedrigeren Konzentrationen zurück. Am dritten Tag der Kultivierung übersteigen diese DsRed-Fluoreszenzwerte die der niedrigeren Kulturen und nehmen bis zum Zeitpunkt 96 h nach Inokulation noch zu. Der Verlauf der DsRed-Fluoreszenzdaten über die Zeit zeigt keinen auffälligen Unterschied zwischen den Kulturen in unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (vergleiche Abb. 3.29 und 3.30, DsRed). Zum Zeitpunkt 72 h nach Inokulation liegen die Fluoreszenzwerte für DsRed in dem Fructose-Medium leicht

3. Ergebnisse

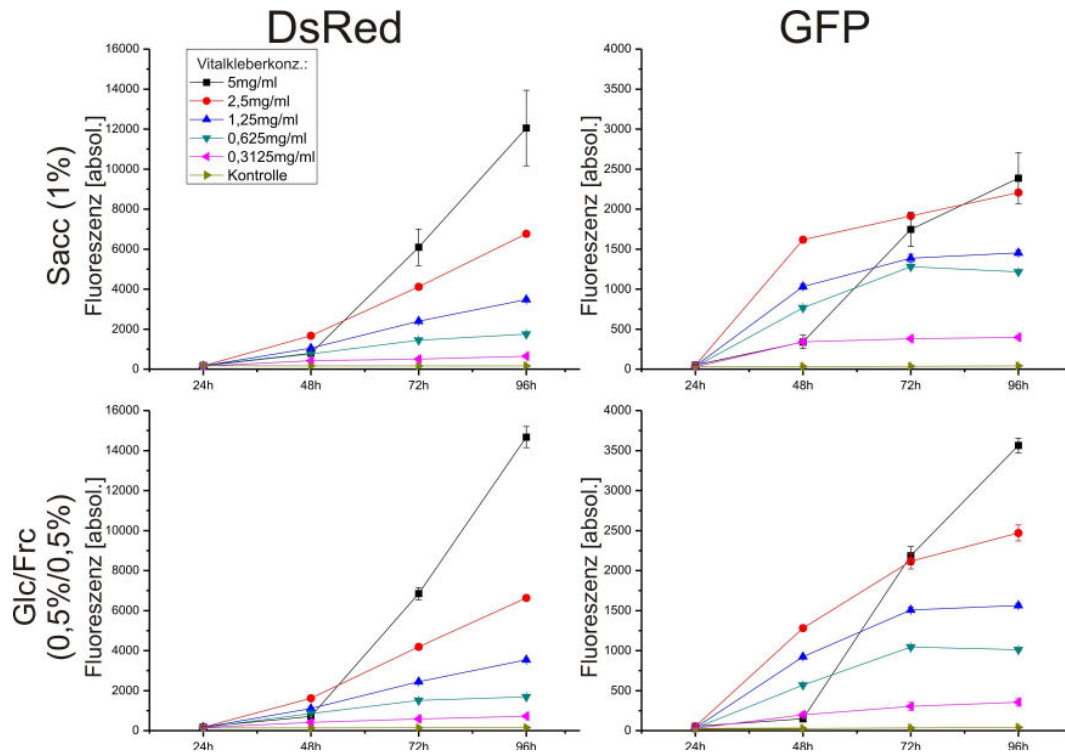


Abbildung 3.29.: Fluoreszenzmessungen von GFP und DsRed in Minikulturen in MM_{mod} , flüssig mit Vitalkleber und Saccharose bzw. Glc/Frc-Mix. Der Verlauf der DsRed-Fluoreszenzen über die Zeit zeigt ein konzentrationsabhängiges Wachstum der Kulturen, mit dem besten Wachstum in den Kulturen mit der höchsten Konzentration an Vitalkleber. Der Verlauf der DsRed-Fluoreszenz in den Kulturen mit Saccharose und dem Gemisch aus 0,5% Glucose und 0,5% Fructose ist annähernd gleich. Bereits 48 h nach Inokulation zeigen die Kulturen unter beiden Bedingungen eine Induktion von *TRI5*Prom::*GFP*, wobei die Kulturen mit der höchsten Konzentration erst zwischen 48 und 72 h eine Aktivierung der *GFP*-Expression zeigen. Die Graphen zeigen jeweils die gemittelten Werte von 16 Kavitäten der 96-Lochplatte, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler über dieses Mittel.

hinter denen in den anderen Medien zurück, daher auch die geringere Fluoreszenz in den gezeigten Fluoreszenzbildern (Abb. 3.31), die zu diesem Zeitpunkt aufgenommen wurden. Die Induktion der GFP-Fluoreszenz hängt im Medium mit Saccharose und dem mit dem Glucose/Fructose-Gemisch ebenfalls von der Konzentration des zugegebenen Vitalklebers ab: Mit zunehmender Konzentration steigt auch die Intensität von GFP (Abb. 3.29, GFP). Nach nur zwei Tagen zeigen die Kulturen eine starke Aktivität des *TRI5*Prom::*GFP*-Stammes in den Medien mit 1% Saccharose und dem Gemisch aus 0,5% Glucose und 0,5% Fructose. In den Kulturen mit 2,5 mg/mL Vitalkleber (rote Kurve) liegen die GFP-Werte bei etwa 1750 (Saccharose) beziehungsweise bei 1250 (Glc/Frc) absoluter Fluoreszenz, während die GFP-Fluoreszenz in Glucose als Kohlenstoffquelle noch unter 1000 liegt (Abb. 3.30, GFP). Nach 96 h gleichen sich diese Werte auf einen

3. Ergebnisse

Wert von etwa 2500 absoluter Fluoreszenz an.

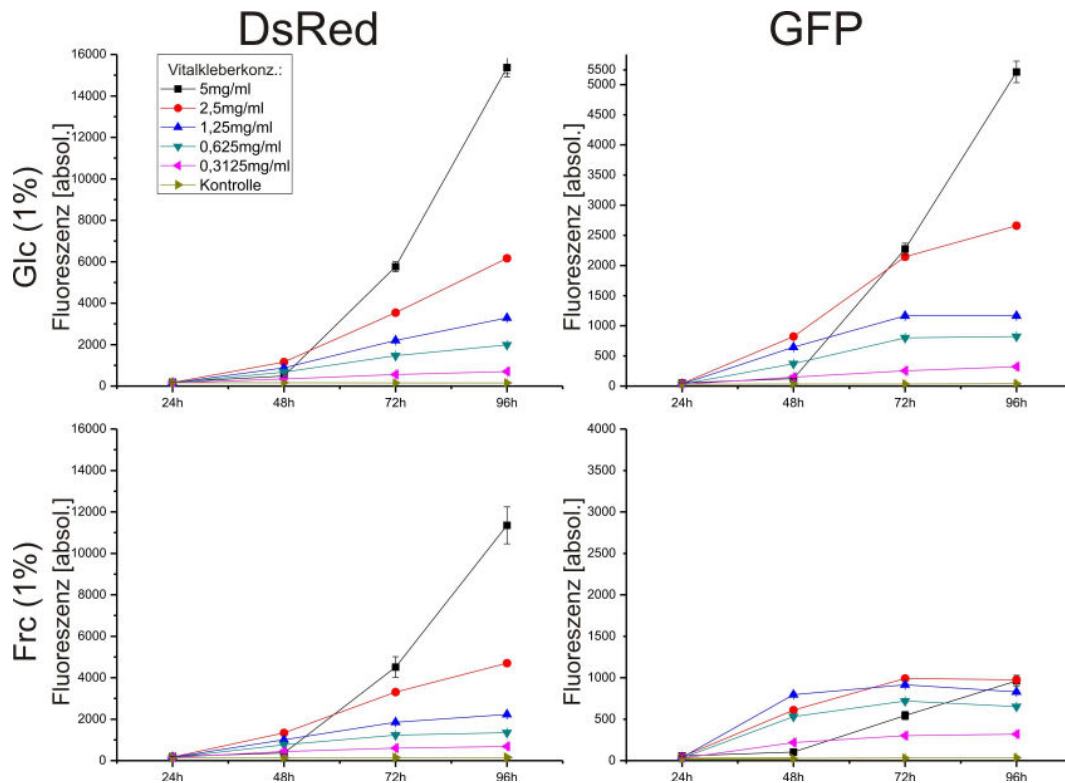


Abbildung 3.30.: Fluoreszenzmessungen von GFP und DsRed in Minikulturen in MM_{mod} flüssig mit Vitakleber und Glucose bzw. Fructose. Der Verlauf der DsRed-Fluoreszenzen über die Zeit zeigt ein konzentrationsabhängiges Wachstum der Kulturen, mit dem besten Wachstum in den Kulturen mit der höchsten Konzentration an Vitakleber. Der Verlauf der DsRed-Fluoreszenz in den Kulturen mit Glucose und Fructose ist annähernd gleich. Die GFP-Intensität in den Kulturen mit Glucose entwickelt sich langsamer im Vergleich zu den Kulturen in Abb. 3.29. Die höchste Konzentration an Vitakleber zeigt auch hier erst bei 72 h eine deutliche Induktion der GFP-Fluoreszenz, die bis zum Ende der Messung noch stark zunimmt. Die GFP-Werte in Fructose erreichen nach 48 bis 72 h ein Plateau und bleiben weit hinter den Werten der anderen Kulturen zurück. Die Graphen zeigen jeweils die gemittelten Werte von 16 Kavitäten der 96-Lochplatte, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler über dieses Mittel.

Auffällig ist aber in allen drei Bedingungen, dass die Kulturen mit der höchsten Konzentration von 5 mg/mL erst zwischen 48 und 72 h eine starke GFP-Fluoreszenz entwickeln, die dann bis zum Ende der Messung nach 96 h weiter zunimmt (schwarze Kurve). In den Minikulturen, die in Fructose als Kohlenstoffquelle angesetzt wurden, zeigt sich, verglichen mit den anderen Zuckern, nur eine sehr geringe GFP-Fluoreszenz. Obwohl die DsRed-Fluoreszenz nach 96 h deutlich zugenommen hat und ähnliche Werte erreicht wie in den anderen Kohlenstoffquellen, erreicht die GFP-Induktion nur einen absoluten Fluoreszenzwert von etwa 1000 (absolute Fluoreszenz). Allerdings zeigt sich in diesem

3. Ergebnisse

Flüssigmedium eine Induktion der *TRI5*-Promotor-GFP-Fusion, während auf den Agarplatten keine Fluoreszenz festzustellen war.

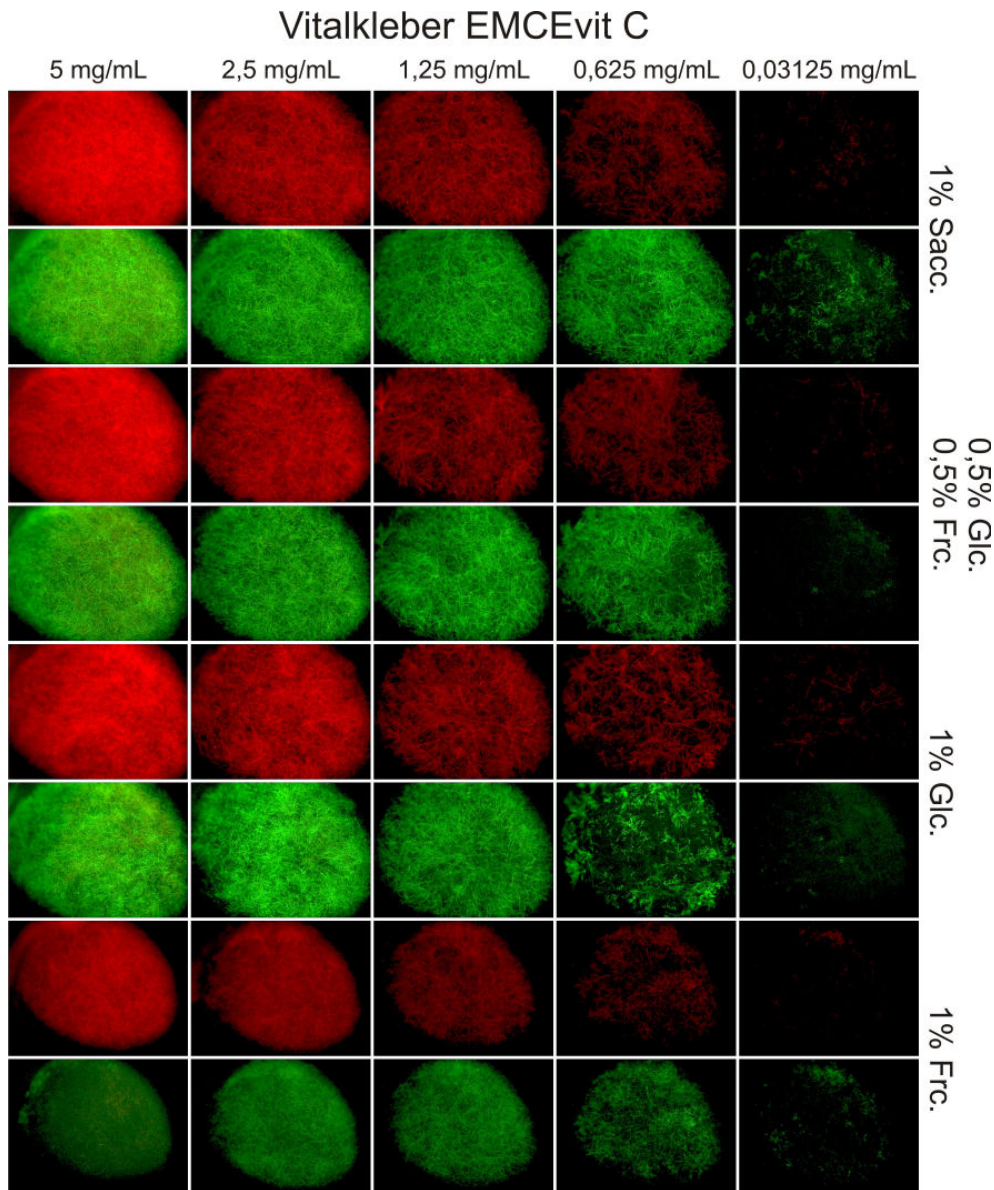


Abbildung 3.31.: *TRI5*-Induktion in Minikulturen in MM_{mod} . flüssig mit Vitalkleber als N-Quelle und unterschiedlichen Zuckern, 72 h. Zur Verwendung kamen 1% Saccharose (Sacc.), eine Mischung aus je 0,5% Glucose (Gluc.) und Fructose (Fruc.), 1% Glucose und 1% Fructose. Auf den DsRed-Fluoreszenzbildern zeigt sich ein uniformes Wachstum aller Kulturen, das jedoch mit abnehmender Konzentration an Speicherprotein ebenfalls abnimmt. Einzig die DsRed-Fluoreszenz der Kulturen in Fructose sind generell schwächer im Vergleich zu den anderen Zuckern.

3. Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle auf die Induktion des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes. Dabei zeigte sich, dass Saccharose, Glucose und ein Gemisch aus gleichen Teilen Glucose und Fructose die Expression des Trichothecen-Genclusters im Vorhandensein der Stickstoffquelle Vitalkleber positiv beeinflussen. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Induktion von GFP zwischen den Kulturen, die auf Fest- bzw. Flüssigmedium angezogen wurden. Während das Myzel auf Festmedium mit Fructose und Ammonium keine Induktion aufwies, zeigten die Kulturen in Flüssigmedium mit Fructose und der Stickstoffquelle Vitalkleber eine, wenn auch geringe, Induktion des GFP-*TRI5*-Promotor-Konstruktes. Diese Ergebnisse deuten auf weitere Faktoren hin, die einen Einfluss auf die Expression der Trichothecenclustergene unter diesen Bedingungen besitzen. Für eine verlässliche Aussage über den Einfluss verschiedener Zucker auf die Induktion der Trichothecenbiosynthese in Anwesenheit von Ammonium oder Speicherproteinen müssen jedoch noch Wiederholungen dieses Versuches sowie auch Messungen der produzierten Toxinmenge durchgeführt werden.

3.6. Methionin Sulfoximin hemmt spezifisch die Glutamin-Synthetase und unterdrückt die *TRI5*-Induktion

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss von Ammonium auf die Induktion der Trichothecenbiosynthese. Um diesen Einfluss weiter aufzuklären, wurden *TRI5*-induzierte Kulturen zusätzlich mit L-Methionin-DL-Sulfoximin (MSX) versetzt und hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer GFP-Induktion untersucht. Diese Reagenz ist als ein spezifischer Inhibitor der Glutamin-Synthetase beschrieben (Ronzio *et al.*, 1969). Dieses Enzym katalysiert die Kondensation von Ammonium und Glutamat zu Glutamin. Die Versuche mit Plattenkulturen unter dem Einfluss von MSX wurden auf modifiziertem Kompletmedium ($CM_{mod.}$) durchgeführt, bei dem das $CaNO_3$ durch eine andere Stickstoffquelle ersetzt wurde. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass der Hefeextrakt-Mix dieses Medium mit einer nicht näher zu definierenden Menge an Aminosäuren und damit auch sekundären Stickstoffquellen anreichert. In Vorversuchen zeigte sich, dass *F. graminearum* auf Minimalmedium mit Ammoniumsulfat und MSX ohne eine zusätzliche N-Quelle sehr stark Wachstums-inhibiert war (siehe Anhang Abb. A.7 auf S. 151). Daher wurde in den $CM_{mod.}$ -Agarplatten auch die Höchste getestete Konzentration von $CaNO_3$, Glutamin und $(NH_4)_2SO_4$ eingesetzt, um einen eindeutigen Phänotyp zu gewährleisten (Abb. 3.32). Dieser zeigte annähernd das gleiche Bild wie der bereits beschriebene Phänotyp auf den Minimalmedien mit unterschiedlichen N-Quellen (siehe Abb. 3.24, Abb. 3.25). Die mit einem Stern markierten Reihen zeigen den Boden der jeweiligen Plattenkultur, da hier die unterschiedlichen Färbungen der Kulturen besser zu dokumentieren waren.

Auf 5 mM $CaNO_3$ zeigt sich ein lineares Längenwachstum ebenso wie auf 5 mM Glutamin. Einzig die unterschiedliche Färbung unterscheidet die beiden Kolonien voneinander (Abb. 3.32). Die Kultur auf 5 mM $CaNO_3$ zeigt in der Mitte der Platte eine Rotfärbung in der Mitte der etablierten Kolonie nach 4 Tagen Inkubation. Das Myzel der Kultur auf 5 mM Glutamin zeigt dagegen eine starke Gelbfärbung, fast über den gesamten Durchmesser der Kolonie. Eine Zugabe von 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ zum Kompletmedium bewirkt, wie auf MM, ein eingeschränktes Längenwachstum mit gleichzeitig starker Hyphenverzweigung und, wie bei 5 mM Glutamin, eine Gelbfärbung des Myzeliums. Die Verzweigung der einzelnen Myzelfäden fällt jedoch nicht ganz so stark aus wie auf Minimalmedium (vergleiche hierzu Abb. 3.25 auf S. 75). Unter Einfluss einer Konzentration von 2 mM des spezifischen Glutamin-Synthetase-Hemmstoffes MSX zeigen sich hinsichtlich der Morphologie keine großen Unterschiede auf $CaNO_3$ und Glutamin. Das Längenwachstum des Myzels ist

3. Ergebnisse

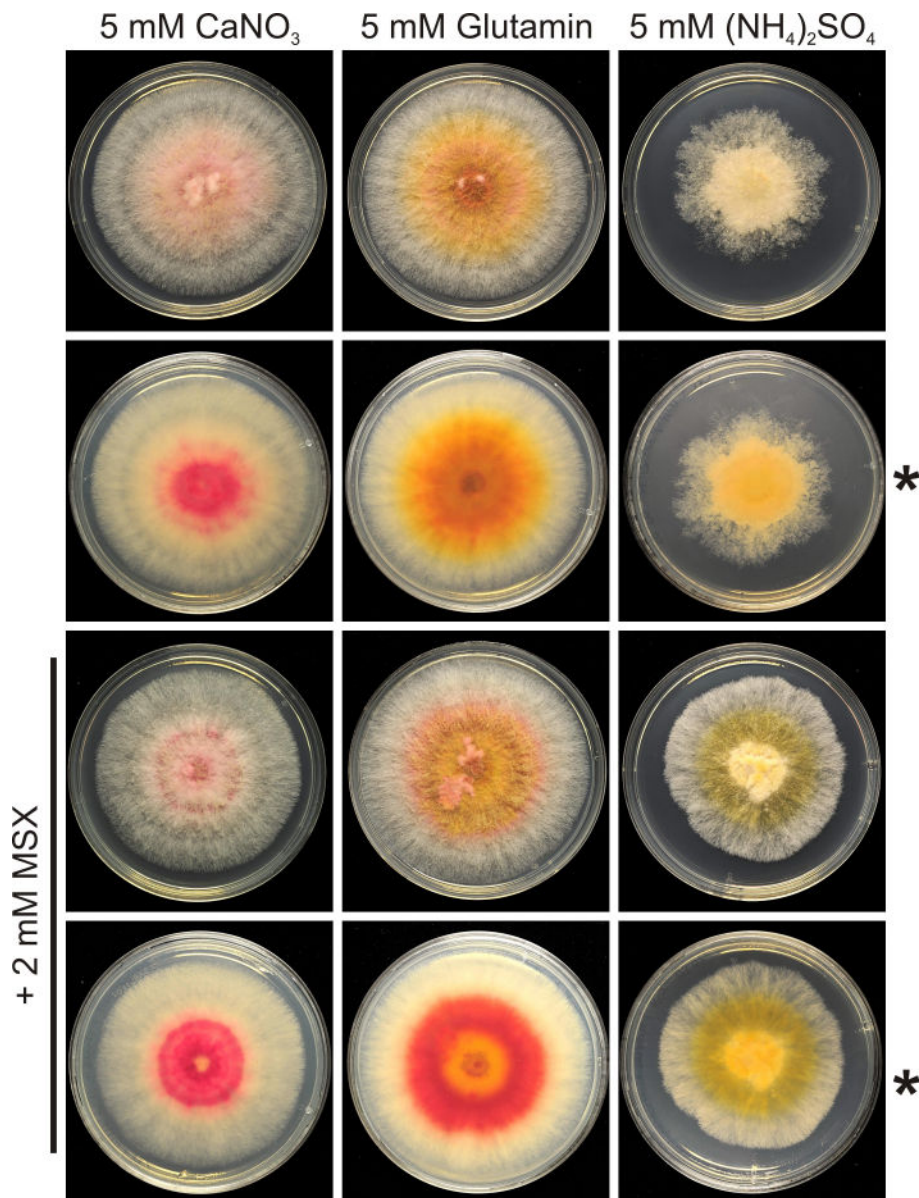


Abbildung 3.32.: Phänotyp von *F. graminearum* auf CM_{mod} -Agarplatten mit versch. N-Quellen, 4 dpi. Die Kolonien von *F. graminearum* zeigen je nach Stickstoffquelle ein deutlich voneinander unterscheidbares Wachstumsverhalten. Mit 5 mM $CaNO_3$ wächst das Myzelium linear und macht wenig Verzweigungen. Mit 5 mM Glutamin ähnelt das Wachstum dem auf Calciumnitrat, jedoch kommt es nicht zu einer Rotfärbung des Myzels. Mit 5 mM Ammoniumsulfat zeigt *F. graminearum* ein sehr eingeschränktes Längenwachstum und das Myzel weist eine starke Verzweigung auf. Unter Einfluss des Glutamin-Synthetase-Hemmers MSX zeigt sich bei Nitrat und Glutamin eine leichte Zunahme der Färbung, ansonsten bleibt der Phänotyp gleich. Bei $(NH_4)_2SO_4$ mit MSX wird der Wachstumsphänotyp mit Ammoniumsulfat alleine aufgehoben und es kommt zu einem verstärkten Längenwachstum der Hyphen. Reihen mit einem Stern markiert zeigen die Unterseiten der Agarplatten.

3. Ergebnisse

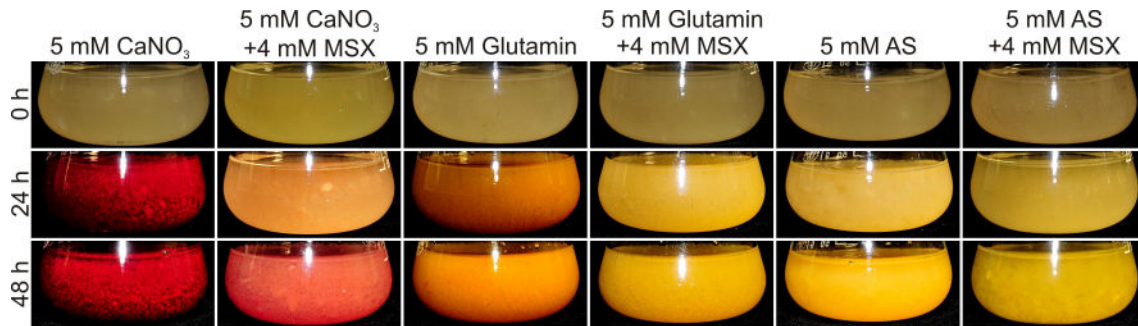


Abbildung 3.33.: Flüssigkulturen in MM_{mod} mit versch. Stickstoffquellen und MSX nach 0 h, 24 h und 48 h Kultivierung. Zum Zeitpunkt Null wurden die Vorkulturen in Kompletmedium mit Wasser gewaschen und danach in die jeweiligen Medien umgesetzt. Nach 24 h Inkubierung zeigt die Kultur mit 5 mM CaNO₃ eine starke Rotfärbung während die Kultur mit CaNO₃ und MSX nur eine sehr leichte Färbung zeigt, die sich bis 48 h nach dem Mediumwechsel etwas verstärkt, aber nicht das Ausmaß ohne MSX erreicht. Die Kulturen, in denen Glutamin oder AS als Stickstoffquelle dienen, weisen eine zum Teil sehr starke Gelbfärbung auf. Unter Einfluss von MSX kommt es ebenfalls zu einer Gelbfärbung der Kultur, allerdings fällt diese schwächer aus.

unverändert zu den Kulturen ohne MSX, lediglich die Färbung wird intensiver und im Falle des Glutamins geht die Gelbfärbung in eine Rotfärbung über. Allerdings zeigt sich ein bedeutender Einfluss von MSX auf das Wachstum des Myzels auf ammoniumhaltigem Medium. Das Myzel weist deutlich weniger Verzweigungen auf und das Wachstum ähnelt eher dem der Kulturen auf Nitrat oder Glutamin. Allerdings scheint das Wachstum weiterhin etwas eingeschränkt zu sein, da das Myzel im Vergleich zu den anderen Kulturen nach vier Tagen Inkubation noch nicht den gesamten Durchmesser der Agarplatte bewachsen hat. Die Färbung des Myzels zeigt ein helles Gelb und ähnelt somit zumindest in der Färbung den Kolonien auf MM_{mod} mit AS (Abb. 3.25, S. 75).

Dieser Versuch wurde ebenfalls in Flüssigmedium durchgeführt, wobei hier eine bereits etablierte Vorkultur in das Minimalmedium mit unterschiedlichen Stickstoffquellen und MSX umgesetzt wurde. Die Vorkulturen wurden 3 Tage in Kompletmedium angezogen, das Myzel nach dieser Zeit abfiltriert und mit einem Vielfachen des Kulturvolumens mit sterilem Wasser gewaschen. Das gewaschene Myzel wurde anschließend in das jeweilige Medium überführt. Zu Beginn der Kultivierung zeigten alle Kulturen den gleichen Phänotyp: leichtes, flockiges Myzel von weißlich gelber Farbe. Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, zeigt die Kultur mit CaNO₃ als Stickstoffquelle bereits nach 24 h eine dunkle Rotfärbung des kultivierten Myzels. Auffällig ist hier, dass das Myzel im Vergleich zu den anderen Kulturen größere Zusammenballungen bildet. Die Kultur mit Nitrat und 4 mM MSX zeigt im Gegensatz dazu nur eine sehr leichte Färbung des Myzels, die mit der Zeit (48 h) zunimmt. Glutamin als Stickstoffquelle führt zu einer dunklen Gelbfärbung der Kultur, wie es bereits auf den Agarplatten beobachtet werden konnte.

3. Ergebnisse

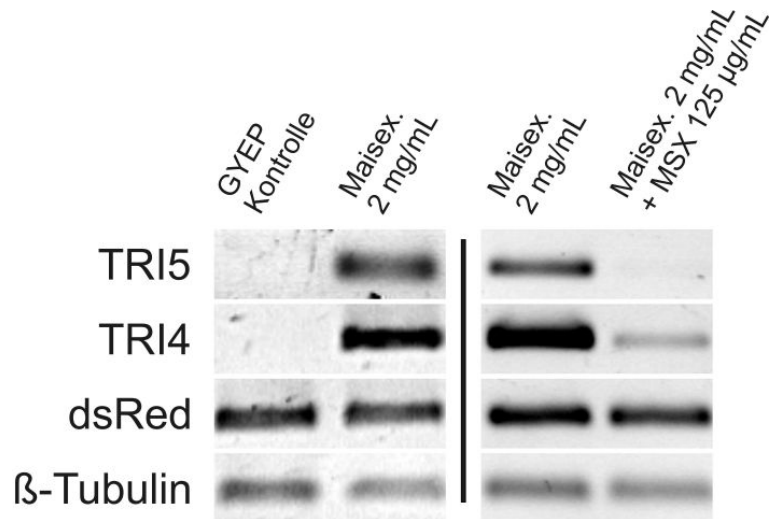


Abbildung 3.34.: Expression von *TRI5* und *TRI4* in Minikulturen in GYEP mit Maisextrakt ohne und mit MSX, 4 dpi. Die Transkriptmengen von *TRI5* als auch von *TRI4* sind in den Maisextrakt-induzierten Kulturen drastisch erhöht. Die Kulturen, die zusätzlich mit 125 µg/mL MSX versetzt wurden, zeigen eine sehr viel geringere Transkription dieser beiden Gene, während die Bandenstärken des DsRed- und β-Tubulingenes auf eine unveränderte Transkription dieser Gene hinweisen. Semi-quantitative PCR mit 28 Zyklen.

Diese Färbung tritt ebenfalls in der mit MSX versetzten Kultur auf, allerdings ist hier die Ausprägung der Farbe ein wenig schwächer als ohne den Glutamin-Synthase-Hemmstoff. Die Gelbfärbung der Kultur kann auch in dem Medium mit 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beobachtet werden. Sie ist schwächer im Vergleich zu der Kultur mit Glutamin, nimmt aber über die Zeit hin zu (48 h). In dem Flüssigmedium mit AS und MSX zeigt sich im Vergleich zu 0 h nur eine sehr geringe Veränderung der Färbung. Zwar zeigt das Myzel auch hier eine Gelbfärbung, aber sie ist sehr schwach verglichen mit der Färbung in den Medien, die mit Glutamin oder Ammoniumsulfat versetzt wurden. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch keine Induktion des *TRI5*-Promotor-GFP Konstruktes unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der gewonnene Maisextrakt in den Minikulturen zu einer sehr starken Induktion des Reporterstammes führt (Abb. 3.22). Um einen möglichen Einfluss von MSX auf die Trichothecenbiosynthese zu klären, wurden Minikulturen in 96-Lochplatten angesetzt, die mit einer Konzentration von 2 mg/mL Maisextrakt versetzt wurden. Eine Hälfte der 96 Minikulturen diente als Kontrolle für die Induktion, während die andere noch zusätzlich mit 125 µg/mL MSX angeimpft wurden. Nach der Ernte der Kulturen und der RNA-Extraktion wurde eine semi-quantitative PCR auf die zuvor umgeschriebenen cDNA durchgeführt. Das Gelelektrophoresebild dieser PCR zeigt einen

3. Ergebnisse

stark erhöhten Expressionslevel der beiden *TRI*-Clustergene *TRI5* und *TRI4* (Abb. 3.34). Als Normierung dienten die Transkripte von DsRed und β -Tubulin. Während die Transkriptlevel dieser beiden Gene, sowohl in der induzierten Kultur als auch in der mit MSX behandelten Kultur, gleich sind, zeigt sich ein drastisches Bild in den mit MSX versetzten Kulturen. Es lässt sich zwar noch eine leichte Bande des *TRI5*-Produktes erahnen und auch die Expression des *TRI4*-Gens ist nicht vollständig unterdrückt, aber die Expression dieser beiden Gene ist erheblich reduziert. Diese drastische Inhibierung der Expression lässt sich auch in der Menge des gebildeten Toxins DON erkennen.

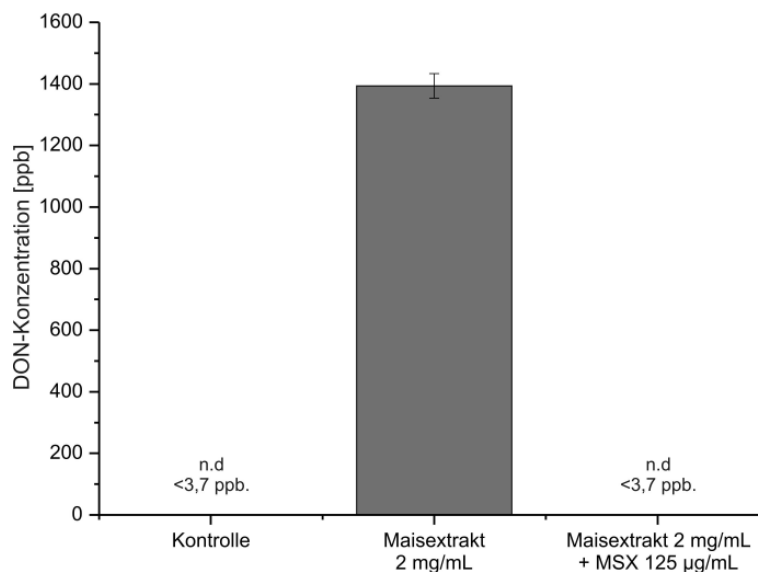


Abbildung 3.35.: DON-Assay von Minikulturen in GYEP mit Maisextrakt und MSX, 4 dpi. Die Medienüberstände aus den Kulturen, aus denen die RNA für die RT-PCR (Abb. 3.34) gewonnen wurde, wurden auf ihre Belastung mit DON untersucht. Sowohl in der Kontrolle (Kulturen in reinem GYEP angezogen) als auch in den Kulturen, die mit Maisextrakt und 125 μ g/mL MSX angezogen wurden, lagen die Messwerte unter dem Detektionslevel des verwendeten ELISA-Testkits (siehe 2.8.1) auf S. 33). In den mit Maisextrakt induzierten Kulturen konnte dagegen eine DON-Konzentration von etwa 1400 ppb gemessen werden. n.d.= nicht detektierbar

Abbildung 3.35 zeigt die Messung des DON-Gehaltes in den Medienüberständen der Minikulturen. In reinem GYEP lag die Menge des gebildeten Toxins unterhalb des Schwellenwertes des ELISA-Tests von 3,7 ppb und war somit nicht detektierbar (n.d.). Der Gehalt an DON in dem Medium mit Maisextrakt liegt bei etwa 1400 ppb und stellt auch die höchste Konzentration dar, die während dieser Arbeit in einer *in vitro*-Kultur gemessen wurde. In den Kulturen mit Maisextrakt und MSX konnte dagegen, wie auch in der Kontrolle, kein Toxin nachgewiesen werden, da die ermittelten Werte unterhalb des messbaren Bereiches lagen.

3.7. Ammonium führt zu einer Änderung des Myzelwachstums

Wie bereits beschrieben wurde, führt die Zugabe von Ammonium zum Medium zu einer Induktion der Trichothecenbiosynthese in *F. graminearum*. Neben dieser sehr spezifischen Aktivierung des sekundären Stoffwechselweges kommt es jedoch auch zu einer drastischen Veränderung des Hyphenwachstums.

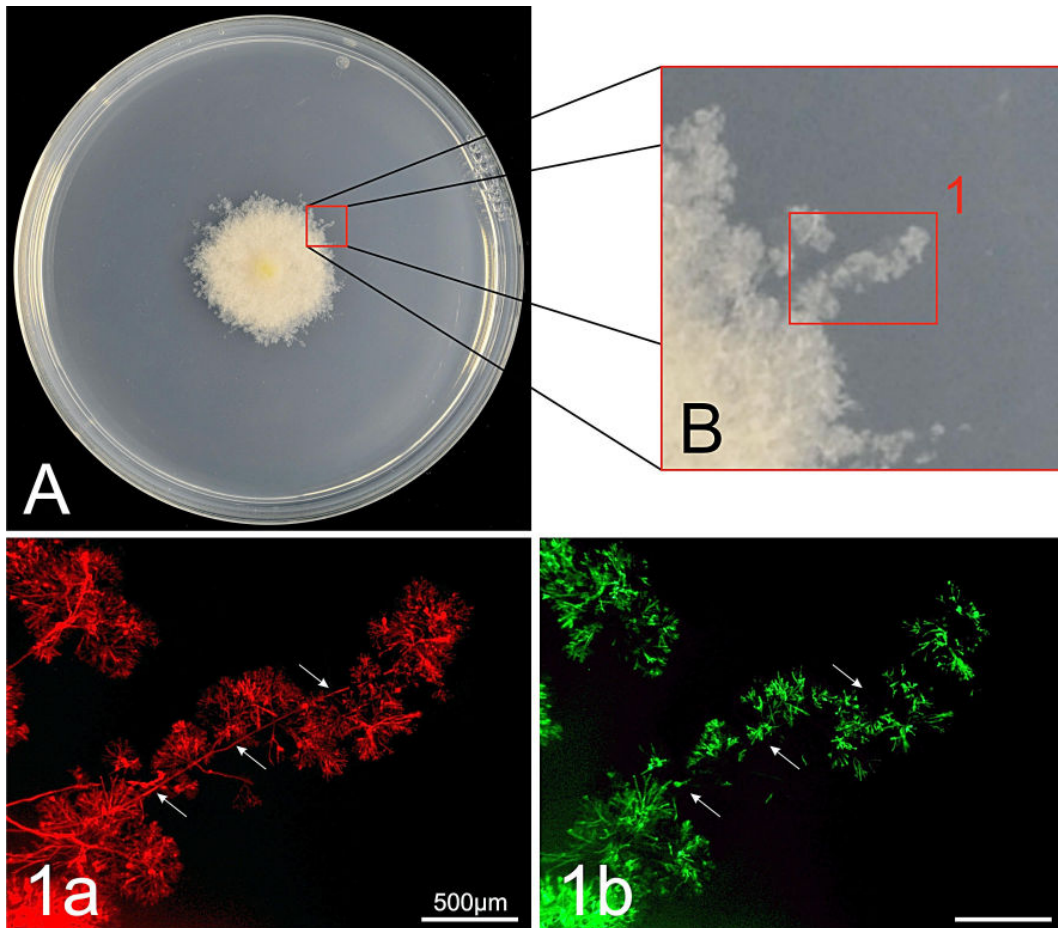


Abbildung 3.36.: Detailaufnahme der Myzelmorphologie auf $MM_{mod.}$ -Agar, Saccharose mit 5 mM AS als Stickstoffquelle, 6 dpi. **A** Übersichtsbild über eine 6 Tage alte Kolonie von *TRI5*Prom::*GFP* auf $MM_{mod.}$ -Agar mit 5mM AS. **B** Detailvergrößerung aus **A**. Das Myzel bildet sehr kurze Hyphen mit vielen Verzweigungen aus. **1a** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der DsRed-Fluoreszenz der Pilzstruktur aus **1**. Die Pfeile deuten auf einen zentralen Hyphenstrang mit vielen Verzweigungen, der jedoch in **1b** keinerlei *TRI5*-Induktion zeigt. Die starken Verzweigungen, die von diesem zentralen Hyphenstrang abgehen, zeigen dagegen eine starke GFP-Induktion.

Wie bereits in der Abbildung 3.25 zu sehen, kommt es etwa ab einer Konzentration von

3. Ergebnisse

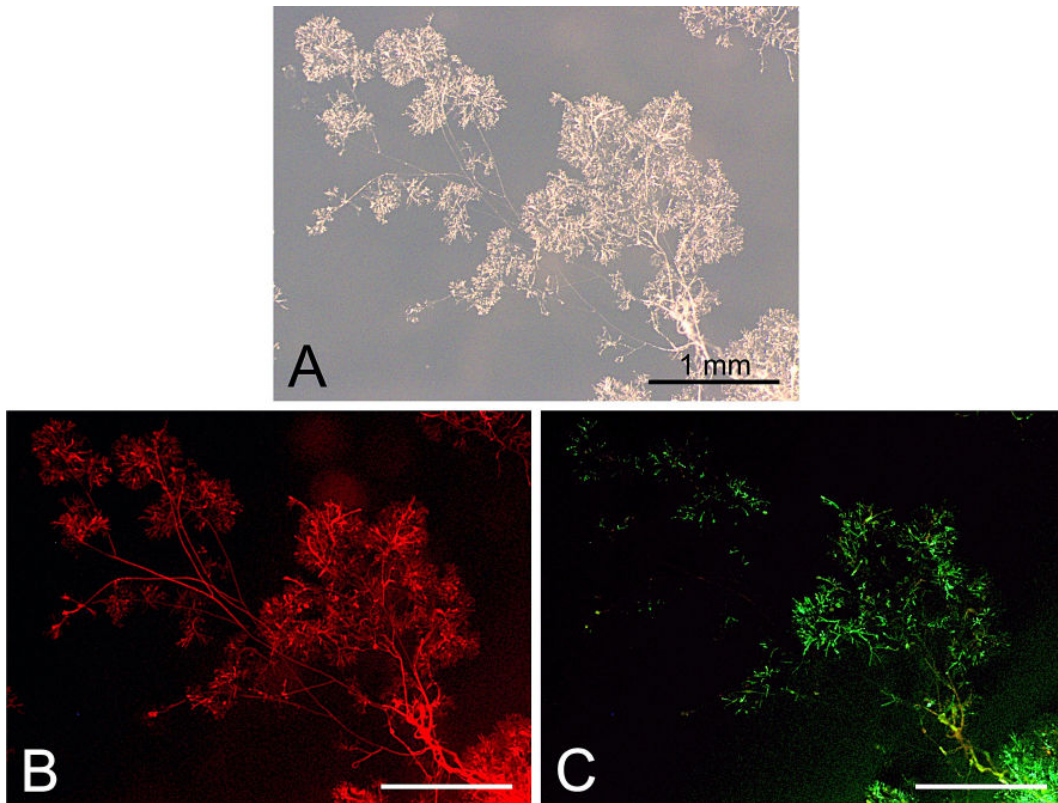


Abbildung 3.37.: Überblick über die Hyphenmorphologie einer Kultur auf MM_{mod} -Agar, Saccharose mit 5 mM AS, 4 dpi. **A** Weißlichtaufnahme, **B** DsRed und **C** GFP. Sowohl unter Weißlicht als auch unter DsRed Anregung sind lange Hyphen zu erkennen, die vom Rand der Kultur radial nach Außen wachsen und sich an den Enden sehr stark verzweigen. Die GFP-Induktion **C** ist jedoch auf eben diese Verzweigungen beschränkt, während die langen Hyphen nur eine starke DsRed-Fluoreszenz aufweisen.

1,25 bis 2,5 mM AS im Medium zu einem stark verminderten Längenwachstum mit einer gleichzeitig starken Verzweigung der Hyphen. Die Detailaufnahmen einer solchen Kolonie auf 5 mM AS in Abbildung 3.36 A zeigen eine sehr differenzierte Morphologie dieser Strukturen. In Abbildung 3.36 B ist eine dieser Strukturen in einer Weißlichtaufnahme vergrößert dargestellt. Die selbe Struktur zeigt unter DsRed-anregenden Bedingungen (3.36 1a) eine langgestreckte zentrale Hyphe (Pfeile) von der wiederum viele Verzweigungen ausgehen. Diese Verzweigungen teilen sich wiederum in viele einzelne kleine Hyphen auf, so dass die dabei entstehende Struktur dem Aufbau einer Koralle ähnelt. Unter GFP-anregenden Bedingungen zeigt sich eine differenziertere Verteilung der *TRI5*-Induktion. Einzelne Hyphen der sehr stark verzweigten Strukturen weisen eine starke GFP-Fluoreszenz auf, während der zentrale Hyphenstrang keinerlei Induktion des *TRI5*Promotor-GFP-Konstruktes zeigt. Ein weiteres Beispiel für diese besondere Hyphenmorphologie auf Ammoniumsulfat als

3. Ergebnisse

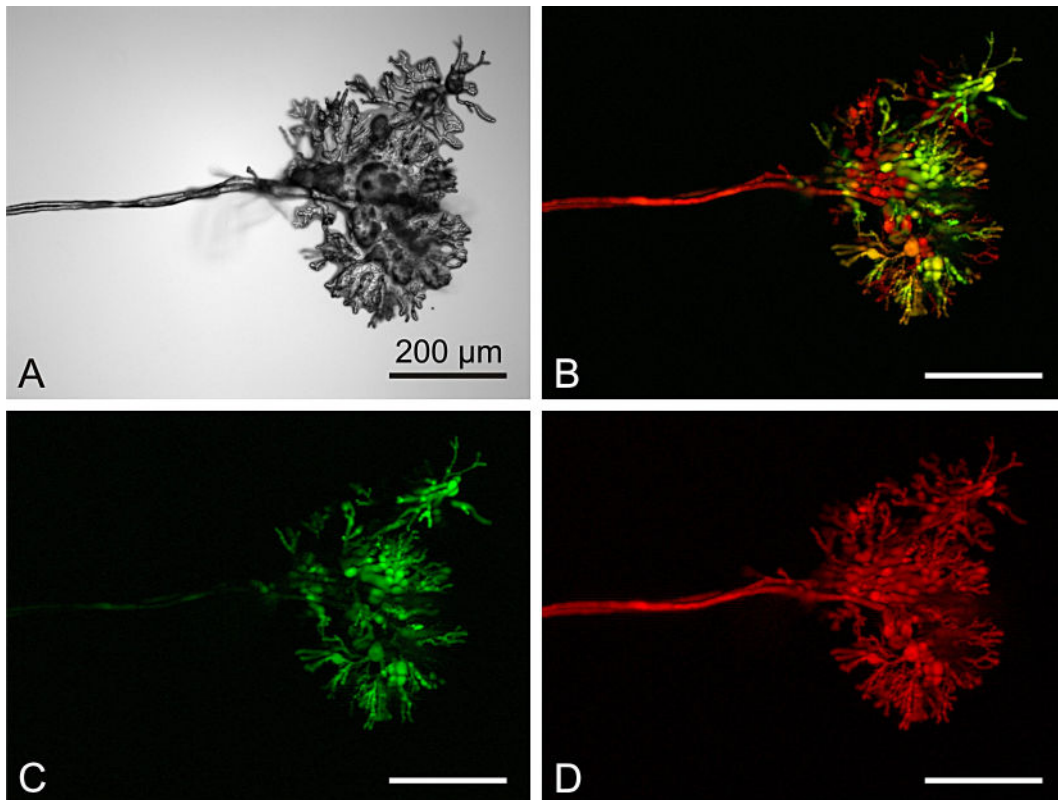


Abbildung 3.38.: Detailaufnahme der Myzelmorphologie auf $MM_{mod.}$ -Agar, Saccharose mit 5 mM AS, 4 dpi. **A** Weiflichtaufnahme, **B** Overlay der DsRed- und GFP-Fluoreszenz, **C** GFP-Fluoreszenz, **D** DsRed-Fluoreszenz. Die typische Morphologie einer solchen Struktur zeigt einen langgestreckten Myzelfaden, der sich an seinem Ende stark verzweigt. Diese stark verzweigten Hyphen zeigen eine sehr starke Induktion von GFP, welche auf eine hohe Expression von *TRI5* hindeutet. Auch der lange Myzelfaden selbst zeigt eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz. Innerhalb der Endstruktur fallen einige verdickte Hyphen auf, von denen sich wiederum sehr feines Myzel weiter verzweigt und feinere Strukturen bildet. Fluoreszenzbilder zeigen eine Maximum-Intensitätsprojektion.

Stickstoffquelle zeigt die Abbildung 3.37, in Weiflicht (**A**) und den einzelnen Aufnahmen in GFP (**B**) und DsRed (**C**). Auch in dieser Abbildung sind die langen Hyphen zu erkennen, die von dem Rand der Kolonie (im Bild nicht zu sehen) ausgehen und an deren Enden sich korallenartige Verzweigungen befinden. Besonders fällt in diesen Aufnahmen auf, dass die langen Hyphen keinerlei GFP-Fluoreszenz aufweisen (**B**), während in den stark verzweigten Enden eine hohe GFP-Induktion zu beobachten ist (**C**). Die Abbildung 3.38 zeigt eine dieser stark verzweigten Hyphenstrukturen in einer Vergrößerung, in Weiflicht (**A**), einem Overlay aus DsRed und GFP (**B**) und den einzelnen Aufnahmen in GFP (**C**) und DsRed (**D**). Auch hier gibt es einen Bereich, in dem die Hyphen sehr langgestreckt und ohne Verzweigungen vorliegen. Am Ende dieses „Steges“ kommt es zu einer sehr starken Verzweigung. In der Mitte dieser Struktur sind einige Hyphen zu erkennen, die ein

3. Ergebnisse

vergrößertes Volumen aufweisen, verglichen mit den filigranen Hyphensträngen, die die restliche Struktur bilden. Wie in den Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen ist, beschränkt sich die Induktion des GFPs und damit auch der Trichothecenclustergene fast ausschließlich auf die stark verästelten Hyphen an der Spitze der Struktur. Die langgestreckte Hyphe des „Steges“ zeigt ebenfalls eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz. Während der mikroskopischen Untersuchungen fiel auf, dass die langen, unverzweigten Hyphen sehr oft nicht die Oberfläche des Agars berührten, sondern die einzelnen stark verzweigten Strukturen wie eine Brücke miteinander verbanden. Auf älteren Platten konnte sehr oft Luftmyzel beobachtet werden, dass aus der Mitte der Kultur herauswuchs. Diese Hyphen waren sehr dünn und wiesen keinerlei Verzweigungen auf. Trafen diese Myzelfäden am Rand der Kultur auf eine freie Mediumfläche, so zeigten sie ebenfalls eine sehr starke Verzweigung und eine Induktion der GFP-Fluoreszenz.

Die in diesen Versuchen gemachten Beobachtungen zeigen, dass Ammonium nicht nur einen starken Einfluss auf die Induktion des Reporterstammes besitzt, sondern einen weitreichenden Effekt auf die Hyphenmorphologie von *F. graminearum* hat. Wächst das Myzel auf ammoniumhaltigem Medium, führt dies zu einer sehr starken Verzweigung der Hyphen an den Stellen, an denen sie den Agar berühren. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass sich die Induktion des Reporterstammes an diesen Kontaktstellen herausbildet. Auch zeigen sich verdickte Hyphen in diesen Bereichen, von denen wiederum sehr stark verzweigte Hyphen ausgehen (siehe auch Abb. A.8 im Anhang, S. A.8).

4. Diskussion

Der filamentöse Askomyzet *Fusarium graminearum* ist eines der weltweit bedeutendsten Phytopathogene. Seine Wirtspflanzen sind Mais sowie kleinkörnige Getreide wie Weizen, Gerste oder Hafer. Ein Befall dieser Pflanzen zieht nicht nur einen großen Ernteverlust durch einen verminderten Kornansatz nach sich, sondern die verbleibenden Körner weisen oft auch eine hohe Konzentration an Mykotoxinen auf. Da diese Toxine äußerst hitzestabil sind, können selbst in verarbeiteten Getreideprodukten lebensgefährliche Konzentrationen dieser Gifte auftreten. Die Mechanismen und Faktoren, die zu einer Induktion der für die Biosynthese der Mykotoxine notwendigen Proteine führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Besonders während des Wachstums auf der Pflanze scheint die Biosynthese dieser Verbindungen nicht konstitutiv, sondern vielmehr spezifisch induziert zu werden. Die am Syntheseweg der Trichothecene beteiligten Gene und Genprodukte sowie regulierende Elemente sind bekannt und beschrieben (Kimura *et al.* , 2007). Allerdings ist immernoch wenig über die Faktoren bekannt, die die Regulation dieses Genclusters beeinflussen. Um einen tieferen Einblick in die Wirt-Pathogen-Beziehung zwischen *F. graminearum* und *T. aestivum* zu erlangen wurde innerhalb dieser Arbeit ein Reporterstamm generiert. Dieser enthält zwei hervorstechende Merkmale: Zum Einen eine durch den *gpdA*-Promotor angetriebene, konstitutive Expression des roten Fluoreszenzproteins DsRed und zum Anderen das grüne Fluoreszenzprotein GFP, das durch den endogenen Promotor des *TRI5*-Gens angetrieben wird. Somit kann sowohl *in vitro* als auch *in planta* das Wachstum als auch die Induktion der Trichothecenbiosynthese verfolgt werden.

4.1. Die Toxinbiosynthese unterliegt einer strikten Regulation *in planta*

4.1.1. Der Reporterstamm zeigt ein wildtypähnliches Verhalten

Da Rückschlüsse auf das Verhalten des WTs gezogen werden sollten, musste der Fluoreszenzstamm einen wildtypähnlichen Charakter während des Wachstums auf der Pflanze aufweisen. Ein einfacher Austausch der Trichodiensynthase-kodierenden Sequenz durch GFP hätte zwar zu einer Mutante geführt, deren GFP vom nativen *TRI5*-Promotor angetrieben worden wäre, allerdings wäre sie nicht mehr in der Lage gewesen, Weizenähren erfolgreich zu kolonisieren (Maier *et al.* , 2006; Jansen *et al.* , 2005; Bai *et al.* , 2001; Desjardins *et al.* , 1996; Proctor *et al.* , 1995a). Die Deletion dieses ersten Enzyms

4. Diskussion

der Trichothecensynthese führt zu einer Mutante mit einer sehr stark eingeschränkten Virulenz und ist somit für einen Vergleich mit dem Infektionsverhalten des WTs nicht brauchbar. In den durchgeführten Pflanzeninfektionsassays konnte der Wildtyp-Charakter von *TRI5*Prom::GFP nachgewiesen werden. Der Reporterstamm zeigt das gleiche Infektionsverhalten wie der WT und befallene Ähren entwickeln die typischen Ährenbleiche-Symptome nach dreiwöchiger Kolonisierung (Abb. 3.3). Das gleiche Bild zeigte sich bei der Infektion von Maiskolben. Auch hier zeigte sich nach einer vierwöchigen Infektionszeit kein Unterschied zwischen dem WT und *TRI5*Prom::GFP (Abb. 3.4). Innerhalb der Promotorsequenzen von *TRI5* sowie anderen *TRI*-Cluster-Genen finden sich putative Bindestellen für *TRI6*. Dieses Gen codiert für ein Zinkfingerprotein, das an der Regulation des Trichothecenbiosyntheseweges involviert ist (Proctor *et al.*, 1995b). Neuere Ergebnisse zeigen, dass eine Integration eines Transformationsvektors die Genexpression der an der Synthese beteiligten Gene beeinflussen und damit zu einer höheren Produktion von 15-ADON führen kann (Chen *et al.*, 2000). Um diesen möglichen Effekt bei dem Reporterstamm auszuschließen, wurde sowohl die Produktion von DON als auch das Expressionsverhalten von *TRI5*, *TRI4*, *TRI6* und *TRI10* im WT und im GFP-Stamm untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression der getesteten Gene in WT und *TRI5*Prom::GFP ein ähnliches Transkriptionslevel aufwiesen und somit ein Integrationseffekt des Transformationsvektors ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.6 A). Die Transkriptlevel von *TRI5* und *TRI4* von Minikulturen in Minimalmedium mit 0,2 M AS zeigen eine deutliche Hochregulation der Expression dieser Stoffwechselgene. Das erhöhte Expressionslevel von *TRI5* geht einher mit einem erhöhten GFP-Transkriptlevel, was den Zusammenhang zwischen beobachteter GFP-Fluoreszenz und *TRI5*-Expression deutlich macht (Abb. 3.5 und 3.6). Das erhöhte Expressionsniveau geht letztendlich einher mit einer erhöhten Konzentration von DON im Medium (Abb. 3.6 B). Durch diese Vortests konnte der wildtypähnliche Charakter des Reporterstammes, sowohl *in vitro* als auch *in planta*, gezeigt werden.

4.1.2. Infektionstests auf Pflanzen zeigen eine gewebespezifische *TRI5*-Induktion

Weizenpflanzen (*cv. Nandu*) wurden mit dem GFP-induzierbaren Reporterstamm zum Zeitpunkt der Anthese inokuliert und der Infektionsverlauf durch die Pflanze unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Die ubiquitäre Expression des rot fluoreszierenden Proteins DsRed half dabei das Pilzmyzel innerhalb des Pflanzengewebes zu lokalisieren und das Myzel von der pflanzlichen Zellwand zu unterscheiden. Der Infektionsverlauf der Reporter-mutante folgte dem bereits beschriebenen Verhalten des WTs. *Fusarium spec.* infizieren

4. Diskussion

die Pflanze über die Blüte und hier scheint im Besonderen eine initiale Kolonisierung des sich entwickelnden Kornes statt zu finden. Wie Jansen *et al.* (2005) zeigen konnten ist DON *kein* Virulenzfaktor für diese erste Besiedelung pflanzlichen Gewebes, denn die toxindefiziente Mutante $\Delta tri5$ war ebenfalls in der Lage die Karyopse zu kolonisieren. Der GFP-Reporterstamm zeigt jedoch in der Karyopse bereits nach drei Tagen Infektion eine starke GFP-Fluoreszenz und damit eine hohe *TRI5*-Aktivität (siehe Abb. 3.7 B-D, Abb. 3.8). Selten konnte eine vergleichsweise schwache GFP-Induktion auf der adaxialen Seite der Blütenblätter beobachtet werden. Diese ersten Ergebnisse sind im Einklang mit Studien, die eine Toxinproduktion bereits in den sehr frühen Stadien der Infektion beobachten konnten (Evans *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigten die Antheren keinerlei GFP-Induktion, obwohl sie bereits nach sehr kurzer Zeit (zwei Tage) vollständig von Myzel überwuchert waren (nicht gezeigt). Ob die Antheren bei der Infektion von *F. graminearum* eine bedeutende Rolle spielen ist nicht bekannt. Es ist jedoch vorstellbar, dass die hohen Anteile von Betain und Cholin als Attraktivstoffe für die frühen Myzelfäden der ausgekeimten Konidien wirken und so zu einem gerichteten Myzelwachstum in Richtung der sich öffnenden Blüten einer Ähre führen (Strange und Smith, 1971; Strange *et al.*, 1974). In den späteren Infektionsstadien, zwischen 4 und 7 Tagen, zeigte sich, dass der Rachisknoten der Bereich innerhalb der Weizenähre ist, der am stärksten GFP-induktiv war (Abb. 3.7 E-G). Auch eine RNA-Extraktion aus infizierten Rachisknoten und der angrenzenden Rachis mit anschließender semiquantitativer PCR konnte zeigen, dass dieser Bereich hochgradig induktiv auf die Trichothecenbiosynthese wirkt (Abb. 3.12). Der Bereich des Rachisknotens scheint in der Pflanzenabwehr eine große Rolle in der Verteidigung der Pflanze gegen einen Phytopathogenbefall zu spielen. Maier *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die Trichothecen-defiziente Mutante $\Delta tri5$ in diesem Bereich durch eine Verdickung der Zellwände daran gehindert wird, sich weiter in der Ähre auszubreiten. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass die $\Delta fgl1$ -Mutante ebenfalls in diesem Gewebe an der weiteren Besiedelung gehindert wird. Dieser Mutante fehlt das Gen für eine sekretierte Lipase. Dieser Verlust führt ebenfalls zu dem Aufbau einer Barriere, die den Pilz in der inokulierten Ähre einschließt (Voigt *et al.*, 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Virulenzfaktoren, FGL1 sowie TRI5, während der Infektion induziert werden und beide für eine erfolgreiche Kolonisierung von Weizen präsent sein müssen. Toxinmessungen von $\Delta fgl1$ -infizierten Ährchen zeigten jedoch eine höhere DON-Konzentration als Ährchen, die mit dem WT infiziert wurden (Voigt *et al.*, 2007). Trotz der erhöhten Konzentration an Toxin konnte die Lipase-defiziente Mutante den Aufbau der Barriere nicht umgehen und blieb in dem inokulierten Ährchen eingeschlossen. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig der Rachisknoten der Weizenährchen in der Abwehr von *F. graminearum* ist. Die sehr

4. Diskussion

hohe Induktion von GFP in dem Reporterstamm zeigt, dass hier eine massive Stimulation der Trichothecenbiosynthese stattfindet. Dies lässt den Schluss zu, dass hier die Trichothecene eine gezielte Pflanzenabwehr unterdrücken und die Pflanze daran hindern, das befallene Gewebe vom Rest der Ähre abzugrenzen. Während DON ein Virulenzfaktor auf Weizen ist, ist die Frage, ob Trichothecene auch für eine erfolgreiche Infektion von Maiskolben benötigt werden, kontrovers diskutiert. Ergebnisse von Freifeldversuchen, die von Harris *et al.* (1999) durchgeführt wurden, zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen Trichothecenproduktion und der Kolonisierung von Mais. Inokulationsversuche der $\Delta tri5$ -Mutante auf Mais, die von Maier *et al.* (2006) durchgeführt wurden, zeigen jedoch, dass hier DON nicht für eine erfolgreiche Besiedelung von Mais von Nöten ist. Allerdings produziert *F. graminearum* große Mengen an Toxin auf Mais, obwohl diese Mykotoxine nur eine untergeordnete Rolle für den Infektionsverlauf zu spielen scheinen. Darum liegt der Verdacht nahe, dass es eine oder vielleicht mehrere Komponenten in Weizen und Mais geben muss, die die Induktion von *TRI5* veranlassen, ungeachtet dessen, ob der eindringende Pilz DON benötigt oder nicht. In ersten Vorversuchen erwies sich die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufes auf Mais als sehr schwierig. Die sehr hohe Eigenfluoreszenz des Maisgewebes machte es nahezu unmöglich, die DsRed- oder GFP-Fluoreszenzen des Reporterstammes zu identifizieren. Daher wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Untersuchung der Infektion auf Weizen gelegt.

4.2. Bioimaging der *TRI5*-Induktion in Minikulturen

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Etablierung eines einfachen und schnellen Tests in dem verschiedene Chemikalien und Substanzen auf ihr Fähigkeit zur Induktion der Trichothecenbiosynthese hin untersucht werden konnten. Dazu wurden Minikulturen des klonierten Reporterstammes *TRI5*Prom::*GFP* in einzelnen Vertiefungen von 96-Lochplatten mit verschiedenen Medien sowie mit unterschiedlichen Additiven angezogen. Die Fluoreszenzen des Reporterstammes wurden unter einer Stereo-Fluoreszenzlupe untersucht sowie mit einem Fluoreszenz-Plattenleser aufgezeichnet. Als Indikator des Myzelwachstums diente das ubiquitär exprimierte DsRed und als Indikator der *TRI5*-Expression wurde das Signal von GFP aufgezeichnet. Durch dieses einfache und kosteneffiziente Testsystem ist es nun möglich, putative Induktoren oder Repressoren der Trichothecenbiosynthese durch einfaches Bioimaging zu identifizieren. Die bis dato benutzten Systeme zur Überprüfung der Trichothecenproduktion, wie HPLC-MS- oder LC/MS-Messungen, waren zeitaufwendig und arbeitsintensiv (Bily *et al.* , 2004; Evans *et al.* , 2000).

Die Induzierbarkeit des *TRI5*Prom::*GFP*-Konstruktes wurde zunächst mit der Zugabe von

4. Diskussion

AS zum Medium überprüft (Covarelli *et al.*, 2004; Lemmens *et al.*, 2004). In Minimalmedium konnte bei einer Konzentration von 0,2 M bis 0,5 M AS die höchste GFP-Fluoreszenz und Toxinproduktion unter den gegebenen Bedingungen gemessen werden. Damit war der Zusammenhang zwischen GFP-Fluoreszenz, *TRI5*-Induktion und DON-Produktion bewiesen. Auch die anderen getesteten Ammoniumverbindungen (NH_4Cl und NH_4NO_3) zeigten eine Induktion des GFP-Konstruktes. Auf die Rolle des verfügbaren Stickstoffes in der Regulation der Trichothecenbiosynthese wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen (siehe Abschn. 4.6). Neben den Stickstoffsalzen wurden verschiedene Phenylpropanoidsäuren sowie H_2O_2 und Menadion in den Minikulturen getestet. Die *de novo*-Synthese von Lignin sowie die Akkumulation von verschiedenen Phenylpropanoiden in den Zellwänden ist eine normale Reaktion pflanzlicher Zellen, wenn sie mit einem Elicitor oder Pathogen konfrontiert werden (Dixon, 2001; Gómez-Vásquez *et al.*, 2004; Menden *et al.*, 2007). Zum Beispiel erhöht sich die Resistenz von Weizenpflanzen gegen eine Infektion mit *F. graminearum*, wenn die Pflanzen zuvor mit Chitosan behandelt wurden, einem Polysaccharid, das auch in pilzlichen Zellwänden vorkommt (Reddy *et al.*, 1999). Diese Erhöhung der Resistenz ist in diesem Fall durch eine erhöhte Synthese und Ablagerung von Lignin mit einhergehender Verdickung der Zellwände zu erklären, wodurch eine erfolgreiche Infektion durch *F. graminearum* erschwert wird. So wurde für diese phenolischen Verbindungen ein deutlicher Einfluss auf die Ausprägung von FHB sowie die Resistenz von Weizen und Mais gegen eine *F. graminearum*-Infektion beschrieben (McKeehen *et al.*, 1999; Bakan *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2007). Unter den Phenylpropanoiden in Gräsern zeigt die Ferulasäure die höchste Konzentration in der Zellwand und trägt bedeutend zur Stabilität der Zellwände bei. Zusätzlich ist sie massgeblich für die Autofluoreszenzen pflanzlicher Zellwände verantwortlich (Klepacka und Fornal, 2006). Da die Verstärkung der pflanzlichen Zellwand eine Antwort der Pflanze auf einen Pathogenbefall ist, könnte eine erhöhte Expression der *TRI*-Clustergene und der damit einhergehenden höheren Trichothecenproduktion eine entsprechende Reaktion des infizierenden Pilzes gegen die Pflanzenabwehr sein. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Disruption des *TRI5*-Gens in *F. graminearum* eine stark verminderte Virulenz auf Weizen zur Folge hat (Hohn und Desjardins, 1992; Proctor *et al.*, 1995a; Desjardins *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 2001). Im Falle der Infektion des $\Delta tri5$ -Stammes zeigten sich Zellwandverdickungen, besonders im Bereich des Rachisknotens, die die weitere Kolonisierung der Weizenähre erfolgreich verhinderten. Der weiterhin trichothecenproduzierende WT konnte dagegen diesen Bereich des Weizenährchens ungehindert passieren und sich in der restlichen Ähre ausbreiten (Jansen *et al.*, 2005). Der Bereich des Rachisknotens konnte innerhalb dieser Arbeit als der Teil des Weizenährchens identifiziert werden, der die Trichothecensynthese

4. Diskussion

am Meisten induzierte (siehe Abb. 3.7 und 3.10). Möglicherweise verhindert DON, als potenter Inhibitor der Translation (Rocha *et al.*, 2005), die Neusynthese von Zellwandmaterial und ermöglicht so dem invasiv wachsenden Pathogen den Eintritt in tieferliegendes Gewebe. Alle getesteten Phenolsäuren sowie deren Derivate zeigten jedoch keinerlei *TRI5*-Induktion unter den gewählten Bedingungen. Als Einziges konnte eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum und die Keimung ab einer Konzentration höher als 1 mM festgestellt werden. Auch die in den HPLC-Messungen identifizierte *p*-Cumarinsäure hatte keinen induzierenden Effekt in den Induktionsassays. Allerdings kommt es durch eine Infektion der Weizenähre zu einer Zunahme dieser Phenolpropanoidsäure in dem Gewebe des Rachisknotens, wie in den HPLC/MS-Daten gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.21). Es wurde keine Induktion des *TRI*-Genclusters beobachtet, aber wie Boutigny *et al.* (2009, 2010) zeigen konnten, ist Ferulasäure ein effektiver Inhibitor der Expression der Trichothecenclustergene. Kim *et al.* (2006) konnten sogar eine höhere Effizienz von Fungiziden feststellen, wenn gleichzeitig Phenolsäuren mit den Fungiziden verabreicht wurden.

Eine weitere Reaktion pflanzlicher Zellen auf den Kontakt mit einem Pathogen ist die sogenannte „oxidative Explosion“ (oxidative burst) (Strange, 1998; Shetty *et al.*, 2008). Dabei werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder freie Sauerstoffradikale wie das Hyperoxid-Anion (O_2^-) und das Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$) gebildet (Apel und Hirt, 2004). Diese Verbindungen können zum Einen als sekundäre Botenstoffe wirken, und zum Anderen können sie durch Radikalbildung die Quervernetzung der Ligninmonomere (Phenolsäuren wie Ferulasäure, Cumarinsäure etc.) erhöhen und damit zu einer Stabilisierung der Zellwand beitragen (Barceló und Laura, 2009; Shetty *et al.*, 2008; Bolwell, 1999; Rhee, 1999; Mehdy, 1994; Bradley *et al.*, 1992). Wasserstoffperoxid sowie andere ROS-entwickelnde Substanzen (Menadion) wurden unlängst als positive Faktoren für die Toxinproduktion in Flüssigmedium beschrieben. Es gibt auch Hinweise darauf, dass eine bestimmte Konzentration an H_2O_2 in dem Umgebungsmedium vorhanden sein muss, um eine effektive Trichothecenproduktion sicherzustellen (Audenaert *et al.*, 2010; Ponts *et al.*, 2009, 2007, 2006). Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Konzentrationen von H_2O_2 sowie von Menadion in Minimalmedium getestet, allerdings wurde unter den gewählten Bedingungen keine Induktion der GFP-Fluoreszenz beobachtet.

4.3. Versuch der Identifizierung der *TRI5*-induktiven Komponenten aus pflanzlichem Material

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Identifizierung von Faktoren mit einem positiven Einfluss auf die Expression der Trichothecenclustergene und damit auf die Toxinproduktion von *F. graminearum*. In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass sowohl die Karyopse als auch der Rachisknoten des infizierten Weizenkultivars *Nandu* eine sehr starke Induktion der GFP-Fluoreszenz in *TRI5*Prom::GFP hervorrufen (Abb. 3.8, Abb. 3.10). Die Arbeitshypothese, dass verschiedene phenolische Komponenten, die bei einem Pathogenbefall *de novo* synthetisiert werden, für die Induktion der Trichothecembiosynthese verantwortlich sind, konnte nicht gehalten werden: Die Phenolsäuren wie Ferulasäure oder Cumarinsäure erwiesen sich in den Induktionsassays als nicht *TRI5*-induktiv (siehe Abschn. 3.3). Die gemessene DON-Konzentration während des Wachstums von *F. graminearum* auf der Pflanze übersteigt allerdings die *in vitro* gemessenen Konzentrationen um ein Vielfaches (vergleiche Abb. 3.6 B mit Abb. 3.16). Das bedeutet, dass für die Induktion der Trichothecembiosynthese *in planta* andere, möglicherweise mehrere, Faktoren ausschlaggebend sind.

4.3.1. Rohextrakte aus Rachisknoten induzieren GFP

Um den Faktoren für die sehr viel stärkere Induktion der *TRI*-Clustergene während der Infektion der Pflanze näher zu kommen, wurden Vorversuche mit Rohextrakten aus infizierten und Wasser-inokulierten Rachisknoten (Kontrolle) durchgeführt. Dazu wurden die Rohextrakte in den 96-Lochplatten-Assays eingesetzt. In diesen Messungen zeigte sich, dass der Reporterstamm sowohl in den Extrakten aus infizierten Rachisknoten als auch in den Extrakten der Kontrolle ein gesteigertes Wachstum gegenüber der reinen Medienkontrolle aufwies (Abb. 3.17, DsRed). Dieses verstärkte Wachstum ist mit einem Eintrag von zusätzlichen Nährstoffen aus den Rohextrakten des Pflanzenmaterials zu erklären. In den GFP-Fluoreszenzmessungen zeigte sich jedoch eine sehr starke Induktion von GFP in den Kulturen, die mit den aufgeschlammten Proben aus infizierten Rachiselementen („Rachisel. inf + Gewebe“) versetzt wurden. In diesen Proben wurden neben den gelösten Substanzen auch Zellwandbruchstücke der infizierten Rachiselemente in die Kulturen eingebracht (Abb. 3.17 GFP, Abb. 3.18). Der Überstand dieser Proben („Rachisel. inf“), also nur die gelösten Komponenten, zeigten ebenfalls eine höhere GFP-Induktion als die Kontrolle. Die Minikulturen, die mit den Extrakten („Rachisel.“) sowie Zellwandbruchstücken („Rachisel. + Gewebe“) angezogen wurden, zeigten dagegen keine Induktion des Reporterstammes. Dies deutet darauf hin, dass der Faktor, der zu der

4. Diskussion

verstärkten Induktion der Trichothecenbiosynthese in *F. graminearum* führt, eine *de novo*-synthetisierte oder eine erhöhte Konzentration einer bereits vorhandenen Komponente der Pflanzenabwehr gegen das eindringende Pathogen ist. Dieser Faktor scheint wiederum hauptsächlich auf das Gewebe des Rachisknotens beschränkt zu sein, wie ein ähnlicher Versuch mit isolierten Rachisknoten und der angrenzenden Rachis zeigte. Abbildung 3.18 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen von Minikulturen, die unter dem Einfluss von Rohextrakten aus infizierten Rachisknoten und Rachiskompartimenten angezogen wurden. Alle Kolonien zeigen bereits nach 48 h Wachstum eine deutliche GFP-Fluoreszenz. Das Myzel, das mit zusätzlichen Gewebebruchstücken des Rachisknotens angezogen wurde, zeigt im Vergleich zu den anderen Proben allerdings eine sehr viel höhere GFP-Induktion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Faktoren für die *TRI5*-Induktion in der Pflanze zellwandassoziiert sein könnten.

Für die Analyse des infizierten und wasserinokulierten Gewebes wurden unterschiedliche Extrakte hergestellt, die in einer HPLC/MS auf ihre Zusammensetzung hin untersucht wurden (siehe Abschn. 3.3.2 auf S. 66). Der Vergleich der HPLC-Läufe von infizierter Probe und der Kontrolle zeigte deutliche Unterschiede in der Höhe und auch in der Anzahl der Peaks. Die beiden auffälligsten Peaks sind in Abbildung 3.19 mit I und II markiert. Der Peak in I konnte zweifelsfrei als *p*-Cumarinsäure identifiziert werden, da sowohl sein Ionenchromatogramm (Abb. 3.20) als auch seine Massenspektren und sein UV-Spektrum (Abb. 3.21) mit dem der als Standard unter gleichen Bedingungen vermessenen *p*-Cumarinsäure übereinstimmen. Dieses Ergebnis bestätigt eine starke Zunahme der *p*-Cumarinsäure-Konzentration in dem isolierten Weizengewebe *nach* der Inokulation mit *F. graminearum*. Auch in dem Wirt-Pathogen-System zwischen Banane (*Musa acuminata*) und *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* konnte eine Zunahme von Ferulasäure und *p*-Cumarinsäure im Wurzelgewebe nach Kontakt mit einem Elicitor aus der pilzlichen Zellwand beobachtet werden (de Ascensao und Dubery, 2003). Die Komponente in Peak II konnte leider nicht identifiziert werden. Ihre Ionenchromatogramme sowie ihr UV-Spektrum finden sich im Anhang (Abb. A.4 auf S. 148). Neben der Zunahme einiger Signale in dem UV-Spektrum des EtOH-Extraktes konnte auch die Zunahme einiger Massen im Massenchromatogramm beobachtet werden, die keine Absorption bei 300 nm zeigten. Die Abbildung A.5 im Anhang (S. 149) zeigt die Ionenchromatogramme der UV-Spektren aus Abbildung 3.19. Allerdings konnten auch diese Komponenten nicht eindeutig identifiziert werden. Eine mögliche Interpretation der höheren GFP-Induktion durch den Rachisknoten-Extrakt wird in Abschnitt 4.6.1 diskutiert.

4.3.2. Speicherproteine aus Weizen und Mais induzieren die Toxinproduktion

In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte nicht nur der Rachisknoten eine sehr starke Induktion des *TRI5*Prom::GFP-Konstruktes, sondern auch die Karyopse (Abb. 3.8). Dies war insofern überraschend, da jüngste Untersuchungen zeigen konnten, dass eine trichothecendefiziente Mutante von *F. graminearum* dieses Gewebe ohne weiteres kolonisieren konnte (Jansen *et al.* , 2005). Ebenso gelang es der $\Delta tri5$ -Mutante ohne Weiteres, inokulierte Maiskolben zu bewachsen und unterschied sich in dieser Hinsicht nicht vom WT. Möglicherweise sind in beiden Fällen die gleichen oder ähnliche Komponenten für die Induktion der Trichothecenbiosynthese verantwortlich, auch wenn DON in diesen Fällen nicht für eine erfolgreiche Kolonisierung benötigt zu werden scheint. Die Tatsache, dass in diesen Geweben ein hohe Induktion der *TRI*-Clustergene stattfindet, obwohl sie für eine erfolgreiche Infektion nicht benötigt werden, legt die Vermutung nahe, dass hier andere induktive Faktoren als im Rachisknoten eine Rolle spielen könnten. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden alkoholische Extrakte aus Weizen- und Maismehl hergestellt und in den Induktionsassays an Minikulturen des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes getestet. Die Ergebnisse zeigen eine sehr starke Induktion der GFP-Fluoreszenz durch Zugabe dieses Rohextraktes (Abb. 3.22) und führten auch zu der höchsten, während dieser Arbeit *in vitro* gemessenen, DON-Konzentration im Medium (Abb. 3.35). Auch die aufgereinigte Proteinfraction aus Weizen (Vitalkleber EMCE VitC, Mühlenchemie AG, Ahrendsburg) zeigte diesen Effekt (Abb. 3.31). Keine der zuvor getesteten Chemikalien oder Extrakte war in der Lage ein solches Ausmaß an Gen-Transkript (Abb. 3.34), GFP-Fluoreszenz und DON-Konzentration in den durchgeführten Assays hervorzurufen. Den Hauptbestandteil dieser Extrakte machen die in alkoholischen Lösungen (70% EtOH, 55% Isopropanol) löslichen Speicherproteine der Weizen- und Maiskörner aus (Zörb *et al.* , 2010; Holding und Larkins, 2008; Branlard und Bancel, 2007). Neben der Stärke mit etwa 70% Anteil am Trockengewicht eines Getreidekorns macht die Gesamtheit aller Proteine etwa 8-15% des Gewichtes aus (Halford und Shewry, 2007). Wiederum etwa 50% des Gesamtproteins entfällt auf die Speicherproteine des Korns (Shewry und Halford, 2002).

Die einzige physiologische und biologische Funktion dieser Proteine besteht in der Speicherung und Bereitstellung von stickstoffreichen Aminosäuren für den sich entwickelnden Keimling. So zeichnen sie sich durch einen hohen Anteil der Aminosäuren Prolin und Glutamin aus, was auch zu ihrer Bezeichnung als „Prolamine“ führte. Der Aufbau aller Prolamine zeigt repetitive Aminosäuresequenzen, die sowohl in ihren Sequenzmotiven als auch in der Häufigkeit der Wiederholung stark variieren können (Shewry *et al.* , 1995). Bei

4. Diskussion

Components	M_r (% total prolamins)	Polymers or monomers	Partial amino acid composition (mol%)
Gluten protein			
HMW prolamins HMW subunits of glutenin	65–90 000 (6–10%)	polymers	30–35% Gly, 10–16% Pro, 15–20% Gly, 0.5–1.5% Cys, 0.7–1.4% Lys
S-rich prolamins γ -gliadins α -gliadins	30–45 000 (70–80%)	monomers monomers	30–40% Gln, 15–20% Pro, 2–3% Cys, < 1.0% Lys
B- and C-type LMW subunits of glutenin ^a		polymers	
S-poor prolamins ω -gliadins	30–75 000	monomers	40–50% Gln, 20–30% pro,
D-type LMW subunits of glutenin ^a	(10–20%)	polymers	8–9% Phe, 0–0.5% Lys, 0–0.5% Cys ^b
Zeins			
α -zeins Z19 ^c Z22 ^c	23–24 000 26 500–27 000 (75–85%)	monomers, dimers and oligomers	\approx 20% Gln, 13–14% Ala, 17–19% Leu, 3–7% Val, 9–10% Pro, < 1% Cys, 0% Trp
β -zein	17 500 (10–15%) ^d	Polymers	16.5% Gln, 9% Pro, 14% Ala, 4.4% Cys, 11.4% Met, 0% Trp
γ -zeins 27K ^c 16K ^c	22 000 17 800 (5–10%) ^d	polymers polymers	15–19% Gln, 15–25% Pro, \approx 7% Cys, < 2% Met, 0–0.6% Trp
δ -zeins 10K ^c 18K ^c	14 400 21 100 (< 5%) ^d	polymers polymers	12% Gln, 16% Pro, 2–4% Cys, 23–27% Met, 0–1% Trp

^a C-type LMW subunits are essentially polymeric forms of γ - and α -gliadins and D-type subunits polymeric ω -gliadins. The B-type LMW subunits constitute a discrete group of S-rich prolamins;

^b Cys is present in D-type LMW subunits but not ω -gliadins;

^c Designations based on relative molecular mass determined by SDS-PAGE;

^d Quantitative data on zeins are from Esen (1987) but Coleman and Larkins (1999) describe γ -zeins as the second most abundant group.

Abbildung 4.1.: Übersicht der Speicherproteine aus Weizen (Gluten) und Mais (Zeine, Tabelle aus Halford und Shewry (2007)). Beachtenswert ist die hohe Glutamin- (Gln) und Glycinkonzentration (Gly) innerhalb der Proteine zwischen 12 und 50% der gesamten Aminosäuren.

4. Diskussion

den *Triticales* (Weizen, Gerste und Roggen) lassen sich die Prolamine in schwefelreiche (α -Gliadin, γ -Gliadin, niedermolekulare Glutenin-Untereinheiten) und schwefelarme (ω -Gliadin) Prolamine sowie in solche mit einem hohen Molekulargewicht (hochmolekulare Glutenin-Untereinheiten) einteilen. Innerhalb dieser Unterteilung kann nochmals eine Charakterisierung in Monomere (Gliadine) und Polymere (Glutenine) vorgenommen werden. Einige der Prolamine aus Weizen sind mit denen aus Mais strukturell verwandt. So zeigen die β -, γ - und δ -Zeine des Mais Ähnlichkeiten zu den S-reichen und hochmolekularen Prolaminen aus Weizen. Im Gegensatz dazu ist die Hauptgruppe der Prolamine in Mais, die α -Zeine, nicht mit den Prolaminen der *Triticales* verwandt (Halford und Shewry, 2007). Sowohl den Prolaminen des Weizens als auch denen des Mais ist jedoch der hohe Anteil an stickstoffreichen Aminosäuren wie Glutamin gemein. In Abbildung 4.1 sind nochmals die Speicherproteine aus Weizen und Mais in einer Tabelle übersichtlich aufgeführt (Halford und Shewry, 2007). Die Zusammensetzung der Speicherproteine ist ebenfalls maßgeblich für die Backeigenschaften des Mehls verantwortlich. Die Polymere der Speicherproteine aus Weizen, das sogenannte „Klebereiweiß“, geben dem Teig seine plastisch, elastischen Eigenschaften und machen eine Verarbeitung des Mehls zu Nahrungsprodukten erst möglich (Shewry *et al.*, 2002; Shewry und Halford, 2002). Gleichzeitig sind sie aber auch der Auslöser für Zöliakie, einer Autoimmunerkrankung bei der diese Proteine eine Immunantwort und damit Entzündung im Darmepithel des Menschen auslösen können (Tatham und Shewry, 2008). Wie wichtig diese Proteine als Nährstoffquelle für *F. graminearum* während des Wachstums auf Körnern sind, zeigt eine Studie von Boyacioglu und Hettiarachchy (1995). Sie konnten bei *Fusarium*-infizierten Körnern einen Rückgang der Speicherproteine Albumin (33%) und Glutenin (80%) verzeichnen. Der hohe Anteil der Aminosäure Glutamin in der Aminosäurezusammensetzung dieser Proteine zusammen mit dem Ergebnis, dass AS die *TRI5*-Expression induziert, legt die These nahe, dass die Trichothecebiosynthese über einen stickstoffabhängigen Signaltransduktionsweg reguliert wird. Möglicherweise kann so erklärt werden, warum es während der Infektion von Mais durch *F. graminearum* zu einer sehr hohen Toxinkontamination der Körner kommt, obwohl hier DON nur eine untergeordnete Rolle in der Virulenz zu spielen scheint (Maier *et al.*, 2006). Außerdem könnte dies die zum Teil sehr hohe DON-Produktion während unsachgemäßer Lagerung von Weizen- oder Maiskörnern erklären (Schrödter, 2004; Homdork *et al.*, 2000). Inwieweit sich das Ergebnis, dass die Speicherproteine die Expression von *TRI5* positiv beeinflussen, auf die Beobachtung der hohen GFP-Fluoreszenz des Reporterstammes während des invasiven Wachstums auf der drei Tage alten Karyopse (siehe Abb. 3.8 auf S. 51) übertragen lässt, ist unklar. Die Berichte über das erste Erscheinen der Speicherproteine gehen stark auseinander. So berichten verschiedene Arbeitsgruppen, dass

bereits zwei Tage nach Anthese die ersten vollständigen Speicherproteine detektierbar sind. Andere Arbeitsgruppen konnten diese Proteine erst acht oder 10 Tagen nach der Anthese nachweisen (siehe Skerri *et al.* (1988)). Dazu gibt es noch erhebliche kultivarspezifische Unterschiede in der Menge der akkumulierten Speicherproteine (Johansson *et al.* , 1994), so dass es schwer ist, eine einheitliche Aussage über das zeitliche Auftreten, die Komposition und Menge der unterschiedlichen Speicherproteine zu treffen. Die in dieser Arbeit beobachtete sehr hohe Induktion der Trichothecenbiosynthese in der Karyopse drei Tage nach Anthese und Infektion könnte einen Hinweis darauf geben, dass bereits zu diesem Zeitpunkt Speicherproteine gebildet und in den Zellen der Karyopse abgelegt werden. Möglicherweise führen aber nicht die fertigen Speicherproteine zu einer Induktion von *TRI5*, sondern ihre amidigen Vorstufen wie Glutamin und Prolin.

4.4. Nährstoffabhängige Regulation von Stoffwechselgenen in filamentösen Pilzen

Wie hängt die Expression bestimmter Gene und Gencluster mit der Verfügbarkeit von fundamentalen Nährstoffen wie Stickstoff und Kohlenstoff zusammen? Viele phytopathogene Pilze leben in einem sich schnell verändernden Lebensraum und müssen somit in der Lage sein, sich an veränderte Umweltbedingungen zu adaptieren. Besonders die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Kohlenstoff und Stickstoff ändert sich rapide mit dem Zustand der Wirtspflanze. So ist die Nährstoffsituation auf einem Weizenkeimling sicherlich eine andere als die auf einer abreifenden Ähre. Für jede dieser sehr unterschiedlichen Umweltbedingungen benötigen diese Pilze ein ausgefeiltes Netz an Regulationsmechanismen, die ihnen eine spezifische, auf die jeweilige Situation abgestimmte, Genexpression und damit Enzyme zur Verfügung stellen, um überleben zu können (Divon und Fluhr, 2007).

Die Kohlenstoff-Katabolit-Repression (*carbon catabolite repression*, CCR) reguliert auf Transkriptionsebene die Gene, die für die Erschließung und Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen benötigt werden. Für die Gene, die durch diesen Signalweg reguliert werden, ist signifikant, dass ihre Expression durch ein bestimmtes Substrat erhöht oder aber durch die Verfügbarkeit von Glucose unterdrückt wird. Das Element, das dieses Expressionsverhalten in filamentösen Pilzen reguliert ist das „carbon responsive element“ (Cre), ein Cys₂-His₂ Zinkfinger DNA-Bindeprotein, das an die Promotorregionen verschiedener Gene bindet und damit deren Expression reprimiert. Die Funktion dieses Proteins konnte an seinem Homolog in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* eindrucksvoll dokumentiert werden. Wenn Glucose im Medium vorhanden ist bindet das Cys₂-His₂ Zinkfinger DNA-Bindeprotein Mig1 an eine Vielzahl verschiedener Gene im Zellkern und blockiert

4. Diskussion

damit deren Expression. Sinkt jedoch die Glucosekonzentration im Medium wird Mig1 von SNF1 (sucrose non fermenting 1), einer Proteinkinase, phosphoryliert. Das phosphorylierte Protein dissoziiert von der DNA und wandert in das Cytosol (Vit *et al.* , 1997). Durch diesen Mechanismus kann sich die Hefezelle innerhalb von zwei bis drei Minuten auf eine veränderte Umweltbedingung einstellen und so zum Beispiel die Enzyme für den Galactose-Katabolismus (z.B. Galactosidase, *GAL*) oder den Alkohol-Katabolismus (z.B. Alkohol-Dehydrogenase, *ADH2*) bereitstellen (Gancedo, 1998; Vit *et al.* , 1997). Auf diese Weise kann sie sich andere, alternative Kohlenstoffquellen erschließen. Eine Expression dieser Gene ist nicht notwendig, wenn die bevorzugte Kohlenstoffquelle Glucose vorhanden ist, weswegen ihre Promotoren durch Mig1 blockiert werden. Das *creA*-Gen aus *A. nidulans* weist eine 90%ige Sequenzhomologie auf Aminosäurelevel zu *Mig1* auf und es konnte auch in anderen filamentösen Pilzen wie *Fusarium fujikuroi* und *Botrytis cinerea* identifiziert werden (Dowzer und Kelly, 1991; Drysdale *et al.* , 1993; Tudzynski *et al.* , 2000). Auch in diesen Pilzen reguliert dieses Protein eine Vielzahl von Genen, darunter auch einige, die für die Virulenz der Pathogene auf ihren Wirten wichtig sind. So wirkt sich eine Deletion des SNF1-Orthologs in *F. oxysporum* (*FoSnf1*) auf die Produktion von zellwandabbauenden Enzymen (cell wall degrading enzymes, CWDE) sowie auf die Virulenz aus (Ospina-Giraldo *et al.* , 2003). Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass die Serin-Protease des Insektenpathogens *Metarhizium anisopliae* unter dem Einfluss eines CreA-Homologs steht (Screen *et al.* , 1997). Auch das Ergebnis, dass sich die Expression von *Fgl1* aus *F. graminearum* durch die Zugabe von Glucose inhibieren lässt, deutet auf eine Regulation dieser sekretierten Lipase über den CCR-Signalweg hin (Nguyen, 2008; Voigt *et al.* , 2005), wobei dieser Zusammenhang noch weiterer Klärung bedarf.

Einen ähnlichen Regulationsmechanismus gibt es für die Anpassung an verschiedene Stickstoffquellen. Die von vielen Pilzen bevorzugten Stickstoffspezies sind Ammonium, Glutamin oder Glutamat. Auf die Assimilation von anorganischem Nitrat wird erst dann zurückgegriffen, wenn alle Quellen für die bevorzugten Stickstoffspezies versiegt sind (Marzluf, 1997). Die Regulation der Gene, die die Enzyme für die unterschiedlichen Stickstoff-Aufnahmewege bereitstellen, verläuft auf einem ähnlichen Wege wie die Regulation der Kohlenstoffaufnahme über *CreA*. Das „ammonium responsive element“ aus *A. nidulans* (*AreA*) ist ein Cys₂-Cys₂ Zinkfinger DNA-Bindeprotein, das als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen reguliert, die der Stickstoff-Katabolit-Repression („nitrogen catabolite repression“, NCR) unterliegen (Marzluf, 1997; Kudla *et al.* , 1990). So führt zum Beispiel eine Limitierung von Glutamin innerhalb von 15 Minuten zu einem stabilen mRNA-Level der für die Nitratassimilation benötigten Proteine Nitrat- (*niaD*) und Nitritreduktase (*niirA*) in *A. nidulans* (Marzluf, 1997). Crespo *et al.* (2002) konnten

4. Diskussion

zeigen, dass das *AreA*-Ortholog *GLN3* in *S. cerevisiae* abhängig von der verfügbaren Stickstoffquelle durch eine Serin/Threonin-Proteinkinase (TOR, Target Of Rapamycin) aktiviert oder reprimiert wird. In Anwesenheit einer bevorzugten Stickstoffquelle (Ammonium) wird *GLN3* durch TOR phosphoryliert und durch das cytosolische Protein *URE2* gebunden. Im Falle der Stickstofflimitierung, oder wenn TOR durch die Zugabe von Rapamycin gehemmt wird, erfolgt eine Dephosphorylierung von *GLN3* durch die Phosphatase *SIT4*, das Protein *URE2* dissoziiert ab und *GLN3* wird in den Zellkern lokalisiert wo es die Expression der NCR-Gene aktiviert (Beck und Hall, 1999). Eine ähnliche Reaktion konnten Crespo *et al.* (2002) auch durch die Zugabe von *MSX* und der damit einhergehenden Inhibierung der Glutamin-Synthetase (GS) hervorrufen. Auch hier wurde *GLN3* dephosphoryliert und konnte anschließend in den Zellkern wandern. Dies lässt den Schluss zu, dass Glutamin als Produkt der GS vom TOR-Pathway erkannt wird und über diesen Signaltransduktionsweg die Antwort der Zelle auf eine gegebene Nährstoffsituation moduliert.

Die Änderung der Genexpression in Anwesenheit oder Abwesenheit einer bevorzugten Stickstoffspezies betrifft nicht nur die Gene des primären Stoffwechsels. Für *F. fujikuroi* sind die Zusammenhänge zwischen verfügbarem Stickstoff und der Regulation von primärem und sekundärem Stoffwechsel bereits beschrieben. Muñoz und Agosin (1993) beschreiben für *F. fujikuroi* eine Zunahme der Konzentration von Gibberellin wenn in Fermenterkulturen die Konzentration von exogenem Stickstoff abnahm. Umgekehrt kam es zu keiner Synthese von Gibberellin, wenn Ammonium oder Glutamin zum Medium gegeben wurde. Die Inhibierung der GS durch *MSX* führte ebenfalls zu einem Anstieg der Gibberellinproduktion, obwohl Ammonium im Medium verfügbar war. Dies deutete darauf hin, dass Glutamin als Produkt der GS von bedeutender Rolle für die Regulation der an der Gibberellinsynthese beteiligten Gene ist. Diese Ergebnisse konnten von Giordano *et al.* (1999) bestätigt und auch auf die Regulation der Synthese des roten Pigments Bikaverin in *F. fujikuroi* ausgeweitet werden. Sie konnten zeigen, dass sowohl die Synthese von Gibberellin als auch Bikaverin zunimmt, wenn die Verfügbarkeit von Ammonium im umgebenden Medium abnimmt. Interessanterweise zeigte sich in Versuchen mit *F. fujikuroi*, dass eine Deletion des zu *areA* homologen Gens (*areA-GF*) eine drastisch verringerte Synthese von Gibberellin aufwies, selbst wenn die Mutante unter Gibberellin-induzierenden Bedingungen angezogen wurde (Tudzynski *et al.*, 1999). Um ein genaueres Bild über die Regulation der Gibberellin- und Bikaverinsynthese zu bekommen, deletierten Teichert *et al.* (2004) das Gen *glnA-Gf*, kodierend für die Glutamin-Synthetase in *F. fujikuroi*. Die Mutanten waren auch unter stickstofflimitierenden Bedingungen nicht mehr in der Lage, die Gene für die Synthese dieser Sekundärmetabolite zu exprimieren. Eine Zugabe

4. Diskussion

von Glutamin konnte den WT-Phänotyp nur teilweise wiederherstellen.

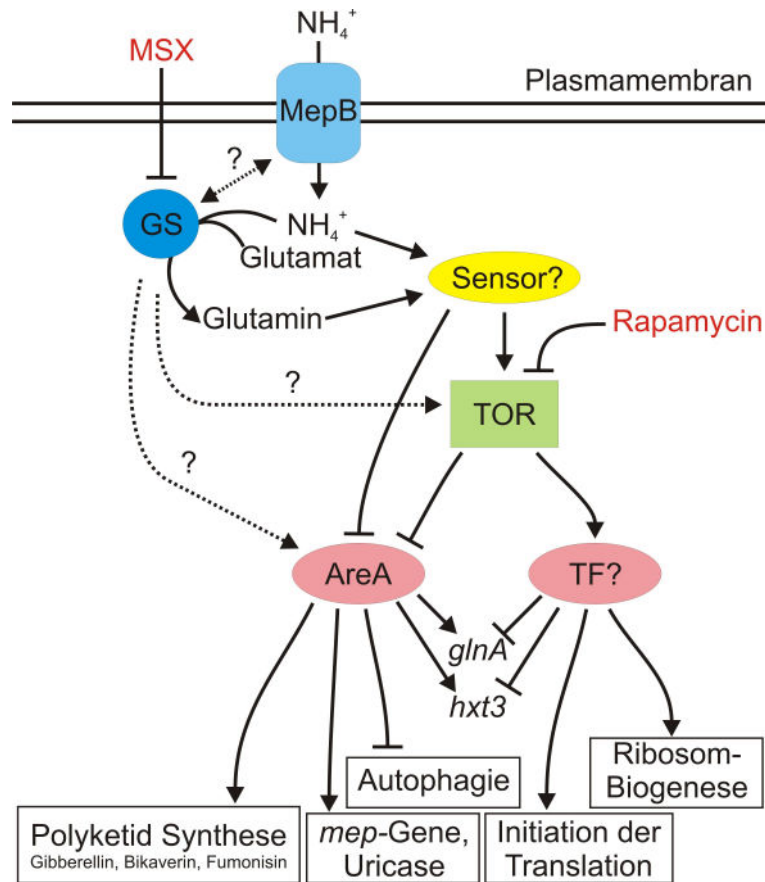


Abbildung 4.2.: Postuliertes Modell der Stickstoffregulation, modifiziert und erweitert nach Teichert *et al.* (2008, 2006).

Weitere Experimente in *F. fujikuroi* konnten zeigen, dass die TOR-Kinase, ähnlich wie in *S. cerevisiae*, in die Signalweiterleitung und die Regulierung der Expression von NCR-Genen involviert ist. Eine Zugabe des TOR-spezifischen Inhibitors Rapamycin führte zu einer Expression vieler Gene, die sonst nur unter Stickstoffmangel exprimiert werden, auch wenn im Medium Ammonium oder Glutamin zur Verfügung stand (Teichert *et al.*, 2006). Auf der Suche nach dem Eingangssignal, das den abwärts liegenden Regulationselementen TOR und AreA die Verfügbarkeit von bevorzugten Stickstoffspezies mitteilt, wurden von Teichert *et al.* (2008) Deletions-Mutanten von drei Ammonium-Permeasen erstellt. Alle drei Ammonium-Permeasen (*mepA*, *mepB* und *mepC*) unterliegen der Kontrolle von AreA und ihre Gene werden unter Stickstoffmangel verstärkt exprimiert. Die Deletion von *mepB* in *F. fujikuroi* führte zu einer verstärkten Expression der stickstoffregulierten sekundären Stoffwechselgene. In der $\Delta mepB$ -Mutante konnte eine deutlich erhöhte Synthese von Bika-

4. Diskussion

verin und Gibberellin, auch unter Ammonium, nachgewiesen werden. Teichert *et al.* (2008) postulieren eine mögliche Ammonium-Sensorfunktion der Ammonium-Permease MepB, die durch die Disruption dieses Enzyms nicht mehr zur Verfügung steht und damit ein Phänotyp hervorgerufen wurde, der dem unter Stickstofflimitierung ähnelt. Möglicherweise ist auch ein Proteinkomplex innerhalb der Plasmamembran aus Ammonium-Permease und Glutamin-Synthetase für die Signalweiterleitung in das Zellinnere und den Zellkern verantwortlich. Einen Hinweis darauf geben Untersuchungen an *E. coli*. Hier scheint der Ammoniumkanal AmtB eine räumliche Assoziation mit der bakteriellen GS einzugehen (Javelle *et al.*, 2005). Die Abbildung 4.2 zeigt ein mögliches Modell der Signaltransduktion für NCR-Gene in *F. fujikuroi*, modifiziert und zusammengesetzt aus den Ergebnissen von Teichert *et al.* (2008, 2006).

4.5. Stickstoff reguliert den Sekundärmetabolismus von *Fusarium graminearum*

Während es für die stickstoffabhängige Regulation von Sekundärmetaboliten in verschiedenen Fusarienspezies wie *F. fujikuroi* (Wiemann *et al.*, 2009; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2009; Teichert *et al.*, 2008; Tudzynski *et al.*, 1999) oder *F. oxysporum* (López-Berges *et al.*, 2010; Divon *et al.*, 2006; Ospina-Giraldo *et al.*, 2003) eine Vielzahl von Informationen gibt, fehlen diese für *F. graminearum*. Um den Einfluss der zur Verfügung stehenden Stickstoffquelle auf die Expression der Trichothecenbiosynthesegene in *F. graminearum* näher zu untersuchen, wurden Pilzkulturen auf unterschiedlichen Medien angezogen. Als basales Medium kam ein modifiziertes Minimalmedium (MM_{mod.}) zum Einsatz. Hier wurden die Spurenelemente beibehalten, während die Kohlenstoffquelle (Glucose, Saccharose oder Fructose) ebenso variiert wurde wie die Stickstoffquelle (CaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl) (siehe Abschn. 2.4.1). Die Abbildungen 3.24, 3.25 und 3.26 zeigen den Wachstumsphänotyp von *F. graminearum* auf Nitrat und Ammonium sowie auf unterschiedlichen Konzentrationen dieser Stickstoffspezies und unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Dabei zeigte sich, dass das Längenwachstum des Pilzmyzels auf Ammonium stark eingeschränkt ist, während das Myzel auf nitrathaltigem Medium bereits nach fünf Tagen die Platte vollständig bedeckt. Ebenso fällt die unterschiedliche Färbung der Platten auf. Die Kolonien auf CaNO₃ weisen eine pinke bis dunkelrote Färbung auf, und das Myzel auf (NH₄)₂SO₄ zeigt eine gelbe bis keine Färbung. Die unterschiedliche Färbung der Kolonien ist vermutlich auf die Synthese des Sekundärmetaboliten Aurofusarin zurückzuführen. Die Synthese dieses Polyketids wird ebenfalls von einem Synthesecuster ausgeführt. Eine Deletion des *PKS12*-Gens in *F. graminearum* führte zu Albinomutanten, die dieses

4. Diskussion

rote Pigment nicht mehr bilden konnten (Malz *et al.* , 2005). Das Gen *PKS12* codiert, ähnlich wie *TRI5*, für das erste Enzym in der Synthesekette von Aurofusarin. Daher fehlen in der $\Delta pks12$ -Mutante die Edukte für die nachfolgenden Enzyme und es kann kein Aurofusarin gebildet werden (Frandsen *et al.* , 2006; Maier *et al.* , 2005; Malz *et al.* , 2005). Interessanterweise zeigen einige Mutanten bei denen regulatorische Elemente des Aurofusarin-Synthesekusters ausgeschaltet wurden eine Gelbfärbung der Hyphen, die jener, der Kulturen auf Ammonium gleicht (Frandsen *et al.* , 2006). Die Gelbfärbung ging bei diesen Mutanten auf eine Akkumulation von Nor-Rubrofusarin bzw. Rubrofusarin zurück, die Monomere des Dimers Aurofusarin. Die unterschiedliche Färbung der Kulturen auf Nitrat bzw. Ammonium legen den Schluss nahe, dass die Aurofusarinbiosynthese in *F. graminearum* ,ähnlich wie die Bikaverinsynthese in *F. fujikuroi*, der Regulation durch AreA und damit der Stickstoff-Katabolit-Repression unterliegt. Dies ist jedoch nur eine Vermutung, da diese Pigmente nicht näher charakterisiert wurden. Durch die Zugabe von MSX zum Medium wurde überprüft, ob die Aktivität der GS ebenfalls wie in *F. fujikuroi* (siehe Abschn. 4.4) ein Teil der Signaltransduktionskette ist. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass *F. graminearum* nicht in der Lage ist auf Minimalmedium ($MM_{mod.}$) mit Ammonium und dem GS-Inhibitor MSX zu wachsen (siehe Abb. A.7 im Anhang, S. 151), wenn Ammonium die einzige Stickstoffquelle darstellt. Daraus lässt sich ableiten, dass die Aktivität der Glutamin-Synthetase essentiell für die Assimilation von Ammonium ist und, dass es in *F. graminearum* keine redundanten Systeme gibt, die einen Ausfall dieses Enzyms kompensieren könnten. Daher wurden Pilzkulturen auf modifiziertem Komplettmedium ($CM_{mod.}$) angezogen. Bei der Herstellung des Mediums wurde das $CaNO_3$ durch 5 mM Glutamin oder AS ersetzt, allerdings der Zusatz des Hefeextrakt-Mixes beibehalten. Dadurch stehen dem Myzel bereits Aminosäuren als Stickstoffquelle zur Verfügung, die ein Wachstum der Kolonien auch unter Einfluss von MSX sicherstellen. Abbildung 3.32 zeigt Pilzkolonien nach vier Tagen Wachstum auf Nitrat, Glutamin und AS als Hauptstickstoffquellen. Auch wenn durch den Hefeextrakt-Mix eine gewisse Grundversorgung an verwertbaren Aminosäuren bereitgestellt wurde, zeigt sich auf Nitrat und Ammonium der gleiche Wachstumsphänotyp wie auf dem bereits beschriebenen Minimalmedium (vergleiche dazu Abbildungen 3.24 und 3.25). Der Phänotyp auf 5 mM Glutamin zeigt eine Mischung der Wachstumsphänotypen auf Nitrat und Ammonium. Zwar wachsen die Hyphen langgestreckt und radial aus der Mitte der inokulierten Platte heraus, aber die Gelbfärbung entspricht eher den Kolonien auf Ammonium. Wird die Aktivität der GS durch die Zugabe von 2 mM MSX unterdrückt, zeigt sich für das Myzel auf $CaNO_3$ kein nennenswerter Effekt. Die rote Pigmentierung scheint mehr auf das ältere Myzel in der Mitte der Platte begrenzt zu sein, aber ansonsten zeigt sich der selbe Phänotyp

4. Diskussion

wie ohne MSX. Auf 5 mM Glutamin mit MSX dagegen zeigt sich eine deutlich erhöhte Produktion des roten Pigments im Vergleich zur Kontrolle ohne MSX. Obwohl Glutamin als das Endprodukt der GS vorhanden ist, scheint eine Induktion der Aurofusarinbiosynthese wie unter stickstofflimitierten Bedingungen stattzufinden. Dies deutet darauf hin, dass die GS neben ihrer enzymatischen Aktivität, möglicherweise, auch eine direkte Funktion in der Signaltransduktion übernimmt. So kann zum Beispiel in dem Bakterium *Bacillus subtilis* die Glutamin-Synthetase selbst direkt mit einem Transkriptionsfaktor interagieren und unabhängig vom TOR-Signalnetzwerk die Expression von Genen steuern. Die GS selbst scheint durch einen Feedback-Loop von ihrem eigenen Produkt Glutamin, bzw. Glutamin-Metaboliten wie Alanin, Glycin oder Serin, in ihrer Aktivität moduliert zu werden (Wray *et al.* , 2001; Eisenberg *et al.* , 2000; Liaw *et al.* , 1993). Ob diese Regulation auch für eukaryotische Systeme zutrifft, bedarf noch weiterer Klärung. Einen weiteren Hinweis auf die Rolle der GS als Teil der Signaltransduktion liefert die Kolonie auf Ammonium unter Einfluss von MSX. Während die Hyphen auf Ammonium eine sehr starke Verzweigung aufweisen scheint die Inhibierung der GS diese Hyphenmorphologie aufzuheben, sodass sie eher den Kolonien auf Nitrat oder Glutamin gleicht. Allerdings scheint selbst unter diesen Bedingungen die Produktion von Aurofusarin limitiert zu sein. Die Hyphen zeigen die gleiche Gelbfärbung, die sie auch auf Minimalmedium mit AS *ohne* MSX zeigen. Dieses überraschende Ergebnis lässt sich dahingehend interpretieren, dass die Aktivität der GS einen direkten Einfluss auf die Aktivität der TOR-Kinase ausübt. Diese Kinase ist ebenfalls an der Regulation des Zellwachstums beteiligt (Crespo und Hall, 2002). In der Hefe *S. cerevisiae* zum Beispiel reguliert der TOR-Komplex 1 das Zellwachstum und sogar den Zellzyklus abhängig von der verfügbaren Stickstoffquelle (Dechant und Peter, 2008). Eine Inhibierung der TOR-Kinase in *F. graminearum* in einem Vorversuch führte zu einer drastischen Reduktion des Längenwachstum, unabhängig von der bereitgestellten Stickstoffspezies (siehe Anhang, Abb.A.9, S. 153). Die Rolle von TOR in der stickstoffabhängigen Regulation von Genen wurde bereits diskutiert (siehe 4.4). Die weitere Beteiligung dieser Proteinkinase an der Regulation der Genexpression in *F. graminearum* wird in einem späteren Kapitel näher betrachtet (siehe Abschnitt 4.6.2). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie sich eine bereits etablierte Pilzkultur verhält, die aus einem Vollmedium (CM) in ein Mangelmedium (MM_{mod.}) mit unterschiedlichen Stickstoffquellen und MSX umgesetzt wird (siehe Abb. 3.33 auf S. 87). Innerhalb von wenigen Stunden wird in der Kultur mit 5 mM CaNO₃ die Aurofusarinbiosynthese induziert und nach 24 h Wachstum zeigt die Pilzkultur eine tiefrote Färbung. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen in *F. fujikuroi* überein, welche unter Stickstoffmangel oder unter Abwesenheit einer bevorzugten Stickstoffspezies (Ammonium) die

4. Diskussion

Hochregulation der Synthese des Pigmentes Bikaverin über das AreA-Signalnetzwerk ergaben (Wiemann *et al.* , 2009; Rodríguez-Ortiz *et al.* , 2009; Giordano *et al.* , 1999). Für die Kultur in 5 mM CaNO₃ und 4 mM MSX wurde der gleiche Phänotyp erwartet. Überraschenderweise blieb in dieser Kultur die Synthese von Aurofusarin hinter jener der Kontrollkultur ohne MSX zurück. Erst nach 48 h zeigte sich eine schwache Rotfärbung des Myzels. Diese Verzögerung der Aurofusarinsynthese in der mit MSX behandelten Kultur ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die GS neben ihrer Enzymaktivität auch als Sensor für die intrazelluläre Stickstoffkonzentration fungiert. Wird die Funktion dieses Sensors durch MSX gestört, kann die Stickstoffsituation der Zelle nicht mehr adäquat gemessen werden, und somit fehlt auch das Signal für die N-abhängige Regulation der NCR-Gene. Eine andere Erklärung für diesen Befund könnte aber auch eine divergentere Regulation des sekundären Metabolismus sein. Möglicherweise existiert neben dem TOR/AreA-Signalweg noch ein weiterer Signalweg, über den Einfluss auf die Genregulation genommen werden kann. Wird einer dieser Wege inhibiert, kommt es zwar auch zu einer Expression der Effekorgene, aber auf einem sehr viel niedrigeren Level verglichen mit dem Expressionslevel in dem Fall, dass beide Signalwege funktional sind. Diese Interpretationen sind jedoch rein spekulativ und benötigen noch weitere Versuche, um die beschriebenen Regulationswege aufzuklären. In den MSX-behandelten Kulturen mit Glutamin und Ammoniumsulfat fallen die Unterschiede in der Färbung zu den Kulturen ohne MSX deutlich geringer aus. Das Myzel weist auch hier eine Gelbfärbung auf, die bereits auf den Agarplatten beobachtet werden konnte. In den mit MSX versetzten Medien ist diese Färbung schwächer, was ebenfalls auf eine geänderte Genexpression hinweist. Die Zugabe von bevorzugten Stickstoffspezies reicht also nicht aus, um das durch die Inhibierung der GS fehlende sensorische Eingangssignal auszugleichen.

Die Kontrolle des sekundären Stoffwechsels insbesondere der Aurofusarinbiosynthese in *F. graminearum* scheint analog zu der Regulation der Synthese von Bikaverin und Gibberellin in *F. fujikuroi* zu sein. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass sowohl das Pigment Aurofusarin als auch das Mykotoxin ZEA durch Polyketidsynthasen synthetisiert werden (Kim *et al.* , 2005; Malz *et al.* , 2005). Inwieweit sich die Verfügbarkeit von unterschiedlichen Stickstoffspezies auf die Expression dieser Gene und damit auch auf die Produktion von ZEA auswirkt, ist noch nicht zu sagen. Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Stoffwechselwege ist eine stickstoffabhängige Regulation der Synthese dieses Toxins durchaus denkbar. Die durch die Hemmung der GS ausgelösten Änderungen in der Genexpression und damit auch der Morphologie geben weitere Hinweise darauf, dass dieses Enzym selbst eine sensorische Funktion bei der nährstoffabhängigen Regulation

der Genexpression in *F. graminearum* einnimmt.

4.6. Stickstoff reguliert die Expression von Virulenzgenen in *Fusarium spec.*

Wie bereits beschrieben wurde, verläuft die Regulation von NCR-Genen in *F. graminearum* auf den selben Wegen wie in anderen filamentösen Pilzen. Im Falle der Nährstofflimitierung werden über sehr spezifische Signaltransduktionswege Sets von Genen aktiviert, die eine ausreichende Versorgung mit den grundlegenden Nährstoffen (Kohlenstoff, Stickstoff) sicherstellen können. So wird zum Beispiel die Expression der Gene *niaD* (Nitrat-Reduktase) und *niitA* (Nitrit-Reduktase) aus *A. nidulans* durch die Verfügbarkeit einer bevorzugten Stickstoffquelle (Ammonium, Aminosäuren) inhibiert (Marzluf, 1997). Gleichzeitig mit der Regulation des primären Stoffwechsels wird über den selben Signalweg auch die Synthese von Sekundärmetaboliten kontrolliert. So sinkt mit der Verfügbarkeit von Ammonium auch die Synthese der beiden Sekundärmetabolite Gibberellin und Bikaverin in *F. fujikuroi* (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2009; Wiemann *et al.*, 2009; Teichert *et al.*, 2008; Linnemannstöns *et al.*, 2002). Viele der Gene, die durch eine Stickstofflimitierung exprimiert werden, haben eine große Bedeutung für die Virulenz eines Pathogens auf seinem Wirt. Das als Pflanzenhormon wirkende Gibberellin aus *F. fujikuroi* steht ebenso unter der Kontrolle der Stickstoff-Katabolit-Repression wie das Avirulenz-Gen *Avr9* aus *Cladosporium fulvum* oder das Hydrophobin *mpg1* in *Magnaporthe oryzae* (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2009; Pérez-García *et al.*, 2001; Snoeijers *et al.*, 2000; den Ackerveken *et al.*, 1994). Eine Deletion des *areA*-Homologs *GAT1* in *Candida albicans* führte zu einer Mutante, die sich im Mausmodell als völlig apathogen darstellte (Limjindaporn *et al.*, 2003). Neueste Ergebnisse in *F. oxysporum* zeigen sogar eine stickstoffabhängige Regulation der Penetrationsfähigkeit dieses Phytopathogens (López-Berges *et al.*, 2010). Diese Resultate zeigen, dass nicht nur Sekundärmetabolite, sondern auch essentielle Virulenzfaktoren einer nährstoffabhängigen Regulation unterliegen.

4.6.1. Ammonium induziert die Expression von *TRI5*

Wie die während dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, verläuft die Expression des Trichothecen-Genclusters antagonistisch zu den bisher in *Fusarium spec.* beschriebenen Genclustern. Die Verfügbarkeit der bevorzugten Stickstoffquelle Ammonium führt nicht zu einer Repression, sondern zu einer verstärkten Expression der *TRI*-Clustergene sowie

4. Diskussion

zu einer hohen Produktion von Trichothecenen. Bereits die Ergebnisse aus der Charakterisierung des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes deuteten auf einen positiven Einfluss von Ammonium auf die Expression der *TRI*-Clustergene hin. Hier führte eine Zugabe von 0,2 M AS in Minimalmedium zu einer Induktion der GFP-Fluoreszenz und der Toxinproduktion (siehe Abb. 3.5 auf S. 46). Diese Konzentration liegt mehr als hundertmal höher als die Ammoniumkonzentration in Agarplatten, bei der bereits eine Induktion des GFP-Konstruktes zu beobachten war (1,25 mM, siehe Abb. 3.25, Abb. 3.28). Eine Interpretation dieses sehr großen Konzentrationsunterschiedes ist rein spekulativ. Das Medium in diesen ersten Tests war das „normale“ Minimalmedium mit einer Konzentration von ca. 6 mM CaNO₃ als Hauptquelle der Stickstoffversorgung. Möglicherweise konkurrieren unter diesen Bedingungen zwei unterschiedliche Signalwege für die Assimilierung von Nitrat und die Aufnahme von Ammonium miteinander, und erst ein deutlicher Überschuss von Ammonium führt zu einer eindeutigen Signalweiterleitung. Diese Versuche müssen allerdings nochmals wiederholt werden und mehrere Bedingungen müssen getestet werden, bevor in diesem Fall eine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Die Suche nach den *TRI5*-induzierenden Faktoren auf der Pflanze führte zu Extrakten aus infizierten Weizenähren. Diese Rohextrakte aus dem Rachisknoten konnten in den Induktionsassays eine eindeutige Induktion der GFP-Fluoreszenz hervorrufen (siehe Abb. 3.17 und 3.18). In den HPLC/MS-Messungen, die mit diesem Gewebe durchgeführt wurden, konnten zwar deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung der Extrakte im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle gefunden, aber nicht eindeutig identifiziert werden. Einzig eine starke Zunahme der *p*-Cumarinsäure-Konzentration in den infizierten Weizenähren konnte nachgewiesen werden. Die Einlagerung neuen Zellwandmaterials und einen zunehmende Lignifizierung sind bekannte Abwehrmechanismen von Pflanzen gegen ein eindringendes Pathogen (Hückelhoven, 2007; Strange, 1998; Bradley *et al.*, 1992). Unter anderem werden über kovalente Vernetzung zwischen Phenylpropanoiden (Ferulasäure, Cumarinsäure, etc.) antimikrobielle Komponenten in die Zellwand integriert (Edreva *et al.*, 2007). In der „Datenbank der natürlichen Produkte“ (Dictionary of Natural Products, Buckingham (2000)) finden sich antifungische Verbindungen wie N-trans-Feruloylagmatin, N-Cinnamoylputrescin oder Feruloylputrescin. Diese Alkaloide wurden aus infizierten Weizenpflanzen oder aus Elicitor-behandelten Zellsuspensionskulturen isoliert und zeigen somit, dass sie Teil der Pflanzenabwehr gegen Pathogene sind. Wie bereits beschrieben, erwiesen sich die getesteten Phenylpropanoide, wie Ferulasäure, als potente Inhibitoren der Trichothecenbiosynthese (siehe Abschn. 4.2, Boutigny *et al.* (2010, 2009)). Die Polyamine Agmatin und Putrescin wurden dagegen von Gardiner *et al.* (2009a) als potente Aktivatoren der Toxinsynthese in *F. graminearum* beschrieben. Betrachtet man

4. Diskussion

die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen so fällt auf, dass die höchste Induktion des GFP-Konstruktes während des invasiven Wachstums im Rachisknoten zu finden ist (Abb. 3.7 und 3.10). Die gleiche Region reagiert bei einer Infektion mit der $\Delta tri5$ -Mutante mit einer Verdickung der Zellwände und der daraus resultierenden Abkapselung des Pathogens vom Rest der Ähre. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine Hypothese über den Ablauf der Infektion und Trichothecenproduktion von *F. graminearum* in Weizen erstellen: Die initiale Infektion beginnt an der Innenseite der Vor- und Deckspelze sowie innerhalb der Karyopse. Dabei wird die Pflanzenabwehr durch freigesetzte Elicitoren induziert und beginnt unter anderem mit der Produktion von Phenylpropanoiden und Phenylamiden. Für die Synthese dieser Komponenten werden amide Vorstufen (u.A. Phenylalanin) benötigt. Die somit höhere Konzentration von frei verfügbarem Stickstoff in Form von Aminosäuren, aber auch die erhöhte Produktion der zellwandgebundenen, stickstoffhaltigen Komponenten, wie den bereits beschriebenen N-trans-Feruloylagmatin oder N-Cinnamoylputrescin, könnte das Signal für die erhöhte Expression der Trichothecenclustergene in *F. graminearum* sein. Die sekretierten Trichothecene wiederum inhibieren die Proteinbiosynthese der Pflanzenzellen durch eine Arretierung der Translation an den pflanzlichen Ribosomen. Durch die vollständige Inhibierung der Translation wären die Pflanze so nicht mehr in der Lage, die für die Abwehr benötigten Komponenten *de novo* zu synthetisieren. Damit ist *F. graminearum* in der Lage, aus dem inokulierten Ährchen auszubrechen und sich letztendlich über die gesamte Ähre auszubreiten.

Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 beschrieben wurde, konnte mit den Rohextrakten aus Weizen- und Maiskörnern die Expression der *TRI*-Clustergene *in vitro* sehr stark induziert werden. Der hohe Anteil an Glutamin und Glycin in den extrahierten Speicherproteinen sowie die Induzierbarkeit von *TRI5* durch AS ergab den Hinweis, dass die Trichothecenbiosynthese in *F. graminearum* von der verfügbaren Stickstoffspezies abhängig ist und damit unter der Kontrolle der Stickstoff-Katabolit-Repression stehen könnte. Durch die Zugabe von MSX zu den, durch 2 mg/mL Maisextrakt induzierten, Minikulturen in den Induktionsassays konnte die Induktion des *TRI*-Clusters unterdrückt werden. Die Expression von *TRI4* und *TRI5* wird durch die Hemmung der GS herunterreguliert, wie Abbildung 3.34 zeigt. Während die Expression der Markergene *DsRed* und β -*Tubulin* unter allen Bedingungen gleich bleibt, zeigen sich starke Banden in der mit Maisextrakt induzierten Kultur. Die mit Maisextrakt induzierten Kulturen unter dem Einfluss von MSX weisen dagegen einen deutlich niedrigeren Transkriptlevel von *TRI4* und *TRI5* auf. Diese Repression der Stoffwechselweg-Gene schlägt sich auch in dem Level des gebildeten Toxins DON nieder. Die Abbildung 3.35 zeigt die Messung der DON-Konzentration aus dem Mediumüberstand der Kulturen. Während die DON-Konzentration in den Kulturen

4. Diskussion

mit Maisextrakt bei etwa 1400 ppb lag, war sowohl in der Kontrolle als auch in der Maisextrakt/MSX-Kultur kein DON nachzuweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Regulation der Trichothecenbiosynthese in *F. graminearum* unter der Kontrolle der an der stickstoffabhängigen Regulation beteiligten Signaltransduktionswege steht.

Allerdings scheint die Induktion der Toxinbiosynthese von mehr als nur einem einzigen Faktor abzuhängen. Aufgrund der gewählten Methode der Speicherproteinisolierung aus Weizen und Mais, lässt sich nicht ausschließen, dass neben den Speicherproteinen auch noch eine nicht näher zu bestimmende Menge an verschiedenen Zuckern extrahiert und aufkonzentriert wurde. Um den Einfluss verschiedener Zucker auf die Expression von *TRI5* zu untersuchen, wurden die Kulturen nicht nur auf den beiden Stickstoffspezies Nitrat und Ammonium angezogen, sondern auch auf Medium mit Glucose, Saccharose und Fructose als Kohlenstoffquellen. Während es keine Unterschiede zwischen dem Wachstum der Kulturen auf den verschiedenen Zuckern auf nitrathaltigem Medium gab (Abb. 3.24), zeigten sich große Unterschiede in der Expression des *TRI5*-Promotor-GFP-Konstruktes, wenn Ammonium die Stickstoffquelle darstellte. Wie aus Abbildung 3.28 zu ersehen ist, gab es die stärkste Expression des GFP-Reporterproteins, wenn die Kulturen auf Saccharose und Ammonium angezogen wurden. Das gesamte Myzel war GFP-induktiv, mit der höchsten Fluoreszenz am Rand der Kolonie und einer leichten Abnahme der Intensität zur Mitte der Kolonie hin (auf dem Bild nicht zu sehen). Im Gegensatz dazu zeigte sich nur eine sehr geringe Fluoreszenz am Rand der Kulturen auf glucosehaltigem Medium und das Myzel auf Fructose zeigte gar keine GFP-Fluoreszenz. In letzterem Fall muss auch darauf hingewiesen werden, dass die DsRed-Fluoreszenz im Vergleich zu den anderen Kulturen schwächer ausfällt. Auch in Flüssigmedium zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der *TRI5*-Expression in Medium mit unterschiedlichen Zuckern. Dieser Versuch wurde in 96-Lochplatten ausgeführt mit $MM_{mod.}$ als Grundmedium und Vitalkleber (EMCEvitC) als Stickstoffquelle. Dabei zeigen die Kulturen in Saccharose, Glucose und einem Gemisch aus Glucose und Fructose das gleiche Wachstumsverhalten, wenn die DsRed-Fluoreszenz als Marker für das Myzelwachstum zu Grunde gelegt wird. In Fructose zeigt sich ähnlich wie auf den Agarplatten eine deutlich geringere DsRed-Fluoreszenz verglichen mit den Fluoreszenzintensitäten der Kulturen und den anderen Zuckern. Die Induktion des GFP-Fluoreszenzproteins ist, anders als auf den Agarplatten, ebenfalls sehr einheitlich. In Saccharose zeigt sich auch bei $31,25 \mu\text{g/mL}$ Speicherprotein noch eine geringe GFP-Induktion. Anders als auf den Festmedien zeigen jedoch die Kulturen in Glucose und auch in Fructose eine deutliche Induktion der Trichothecenproduktion. Ein Einfluss unterschiedlicher Kohlenstoffquellen auf die Induktion der Trichothecenbiosynthese wurde

4. Diskussion

ebenfalls von Jiao *et al.* (2008) sowie Zhang und Wolf-Hall (2010) beschrieben. Auch sie berichten von einer sehr starken Induktion der *TRI5*-Expression in Pilzkulturen, die mit Saccharose als Kohlenstoffquelle angezogen wurden. Die Anzuchtmedien, in denen die Kulturen in diesen Publikationen angezogen wurden, enthielten neben den getesteten Kohlenstoffquellen jedoch auch Stickstoff in Form von 2 g/L Glutamat (Jiao *et al.*, 2008), bzw. Ammoniumchlorid (Zhang und Wolf-Hall, 2010). Eine Beteiligung des CCR-Elementes *creA* an der Regulation der Toxinproduktion scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, da eine Zugabe von Glucose nicht zur Repression der Expression der *TRI*-Gene führte (Jiao *et al.*, 2008). Eine enge Verbindung zwischen den CCR- und den NCR-Signalwegen lässt sich jedoch nicht gänzlich ausschließen. So konnten Teichert *et al.* (2006) in *F. fujikuroi* zeigen, dass ein Hexose-Transporter (*hxt3*) ebenfalls unter der Kontrolle von *areA* steht und unter stickstofflimitierten Bedingungen exprimiert wird (siehe auch Abb. 4.2).

4.6.2. Ammonium nimmt Einfluss auf die Hyphenmorphologie

Ammonium als Hauptquelle des verfügbaren Stickstoffes führte nicht nur zu einer Induktion der Trichothecenbiosynthese, sondern auch zu einer extremen Veränderung des Wachstumsphänotyps von *F. graminearum*. Bereits ab der niedrigsten getesteten Konzentration (31,25 μM) zeigt sich ein eingeschränktes Längenwachstum der Pilzhypen, mit kurzem und sich sehr häufig verzweigendem Myzel. Dieser Wachstumsphänotyp wird mit zunehmender Ammoniumkonzentration immer kompakter. Dass dieser Effekt von Ammonium ausgelöst wird und nicht etwa von Sulfat, zeigt sich auf den Platten mit NH_4Cl als Stickstoffquelle. Sie zeigen das gleiche Wachstum wie unter Ammoniumsulfat. Um auf äquimolare Mengen an Ammonium zu kommen wurde hier allerdings die doppelte Stoffmenge eingesetzt (Abb. 3.26). Die Abbildung 3.36 (auf S. 90) zeigt eine Myzelkultur auf MM_{mod} und Ammonium im Detail. Selbst nach sechs Tagen Wachstum ist die Kultur kaum über den Inokulationspunkt herausgewachsen. Das Myzel ist sehr stark verzweigt und von einer zentralen, linear wachsenden Hyphe gehen einzelne Verzweigungen ab, die in eine Vielzahl weiterer kleiner Hyphen verästeln (Abb. 3.36, 1a). Diese zentrale Hyphe zeigt hauptsächlich die konstitutive DsRed-Fluoreszenz, während die von ihr ausgehenden Verästelungen eine starke GFP-Induktion aufweisen (Abb. 3.36, 1b). Abbildung 3.37 zeigt ebenfalls das stark verzweigte Hyphenwachstum auf Ammonium. In Teilabbildung B fallen besonders die langen, dünnen Hyphen auf, die nur die DsRed-Fluoreszenz zeigen, während die verzweigten Hyphen, die von diesen mittleren Myzelsträngen ausgehen, eine Induktion des *TRI5*Promotor-GFP-Konstruktes aufweisen. In den Abbildungen 3.38 und A.8 sind einzelne dieser besonderen Strukturen höher aufgelöst. Dabei fällt auf, dass sich das Myzel an den Enden der langen unverzweigten Hyphenstränge in sehr viele kleine Myzelfäden

4. Diskussion

aufteilt. In der Mitte dieser Struktur sind aber auch verdickte Zellen zu erkennen. Vielfach wurde beobachtet, dass mit zunehmendem Alter der Kultur Luftmyzel aus der Mitte, also dem älteren Teil der Kolonie, herauswächst. Diese Hyphen sind ebenfalls sehr dünn und kaum verzweigt. Wenn diese Hyphen im Laufe ihres Wachstums wieder Kontakt mit der Agaroberfläche herstellen, entwickeln sich an der Kontaktstelle die selben stark verzweigten Strukturen, wie sie in Abbildung 3.38 und A.8 zu sehen sind. Auf den Agarplatten mit CaNO_3 oder Glutamin als einzige Stickstoffquelle ließen sich diese Strukturen nicht beobachten (siehe Abb. 3.24 und 3.32). Hier zeigten alle Hyphen ein ausgeprägtes Längenwachstum mit wenig Verzweigungen. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Ausbildung dieser besonderen Hyphenmorphologie durch die Verfügbarkeit von Ammonium im Medium ausgelöst wird. Bis jetzt gibt es keinen Literaturverweis, der auf dieses besondere Wachstum von *F. graminearum* unter dem Einfluss von Ammonium hinweist. Auch für andere filamentöse Pilze konnte in der Literatur kein Hinweis auf eine solch drastische Morphologieänderung in Abhängigkeit von der verfügbaren Stickstoffquelle gefunden werden. Einzig für die Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* sind stickstoffabhängige Änderungen der Morphologie bekannt und beschrieben. Auf diese Ergebnisse wird später in diesem Abschnitt eingegangen. Die Morphologie und auch das *TRI5*-Expressionsmuster der Hyphen auf Festmedium mit Ammonium zeigt allerdings Ähnlichkeiten zu Infektionsstrukturen von *F. graminearum* auf Weizen-Hüllblättern, die von Boenisch (2009) beschrieben wurde. In diesen Versuchen wurden die Hüllblätter einzelner Weizenähren isoliert und mit dem *TRI5*Prom::GFP-Reporterstamm infiziert. Nach einigen Tagen der Infektion entwickelten sich einzelne Infektionskissen: Kissen aus stark verzweigten und verdickten Hyphen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Induktion des *TRI5*-Gens zeigten. Wurden diese Kissen manuell entfernt und das darunter liegende Gewebe mit einem Raster-Elektronenmikroskop untersucht, fanden sich mehrere Infektionssporen durch die das Pathogen in das Innere der Zellen eindringen konnte. Analog zu den linearen, unverzweigten Myzelsträngen auf den Agarplatten fanden sich auch auf den Hüllblättern lange, nicht *TRI5*-induzierte Hyphen. Diese sogenannten „Runner“-Hyphen waren deutlich dünner als das Myzel der Infektionskissen, die sie miteinander verbanden. Inwieweit diese auf der Pflanze gefundenen Hyphenstrukturen mit denen der *in vitro*-Kultur homolog sind, kann jedoch nicht abschließend beantwortet werden und ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Der Einfluss von verfügbarem Stickstoff auf das Zellwachstum ist für die Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* dokumentiert. Unter stickstofflimitierenden Bedingungen entwickeln beide Hefen ein Wachstum, das sich durch die Ausbildung von Pseudohyphen auszeichnet, während unter Ammonium das normale Hefenwachstum (Knospung) vorherrscht (Bis-

4. Diskussion

was und Morschhäuser, 2005; Pan *et al.*, 2000). Eine Deletion des zu AreA homologen Transkriptionsfaktors GAT1 in *C. albicans* führte zu einer Mutante, die in der Lage war, Pseudohyphen zu bilden, aber in Tierversuchen nicht mehr pathogen war (Limjindaporn *et al.*, 2003). Diese Anpassung an unterschiedliche Nährstoffsituationen wird über die bereits erwähnte Serin/Threonin-Proteinkinase TOR reguliert (Rohde *et al.*, 2008, 2001; Schmelzle und Hall, 2000). Auch wenn TOR als Schaltstelle in vielen Signaltransduktionswegen einen zentralen Platz einnimmt, benötigt diese Kinase ein Eingangssignal. Im Falle der *F. graminearum*-Kulturen auf Ammonium könnte die GS, neben ihrer enzymatischen Funktion, eine Funktion als Sensor der Verfügbarkeit von Ammonium besitzen. In ihrer Eigenschaft als Sensor könnte sie ein Teil der Signaltransduktionskette sein, der die Anwesenheit einer bevorzugten Stickstoffquelle an die nachfolgende „Schaltstelle“ TOR weitergibt und dadurch eine geänderte Genexpression bewirkt. Wie bereits beschrieben (siehe Abschn. 4.5), konnte durch die Zugabe von MSX ein lineares, unverzweigtes Hyphenwachstum auf Kompletmedium induziert werden, obwohl 5 mM Ammonium im Medium vorhanden war. Dass die Aktivitätshemmung der GS einen so dramatischen Einfluss auf das Wachstum des Pilzes hat, spricht für einen direkten Einfluss dieser Synthetase auf TOR. Da TOR unter Anderem auch das Zellwachstum reguliert (Dechant und Peter, 2008; Crespo und Hall, 2002), und eine Inhibierung von TOR durch den spezifischen Hemmstoff Rapamycin zu einem sehr stark eingeschränkten Wachstum führt (siehe Abb. A.9, S. 153), ist es denkbar, dass im Falle der Verfügbarkeit von Ammonium die GS über TOR einen Einfluss auf die Hyphenmorphologie hat. Einen indirekten Hinweis auf diesen Zusammenhang könnten die Pilzkolonien auf Glutamin als Hauptstickstoffquelle geben. Glutamin ist das Endprodukt der GS, und auf den Agarplatten mit 5 mM Glutamin zeigen die Hyphen ein lineares Wachstum, das dem auf Nitrat gleicht (Abb. 3.32). Eine Inhibierung der GS durch MSX hat auf diesem Medium (CM mit 5 mM Glutamin) keinen Effekt auf das Längenwachstum des Myzels. Möglicherweise wird die GS in *F. graminearum* ähnlich wie in dem bereits erwähnten Bakterium *B. subtilis* von ihren eigenen „downstream“-Produkten (hier Glutamin) in ihrer Aktivität verändert. Dies könnte zur Folge haben, dass unter Glutamin-vorherrschenden Bedingungen eine andere Signalweiterleitung stattfindet, als dies unter Verfügbarkeit von Ammonium der Fall ist. Diese Annahmen sind jedoch rein spekulativ und müssen durch weitere Experimente belegt oder revidiert werden. Im Gegensatz zu dem Myzel auf den Glutaminplatten bleibt das Myzel unter Ammonium und MSX gelb, so dass unter diesen Bedingungen die Aurofusarinbiosynthese weiterhin reprimiert zu sein scheint. Dies könnte ein Anzeichen für einen weiteren Regulationsweg der Pigmentproduktion in *F. graminearum* sein, der unabhängig, aber parallel zu der AreA-vermittelten Repression verläuft. So konnte in *A. nidulans* das bZIP

4. Diskussion

DNA-Bindeprotein MeaB identifiziert werden, das ebenfalls abhängig von der verfügbaren Stickstoffspezies, aber *unabhängig* von AreA, die Expression von Genen induziert (Polley und Caddick, 1996; Wong *et al.*, 2007). Unter diesen Effektorgenen befindet sich *nmrA*, das für einen AreA-Repressor codiert. Das Protein NmrA bindet an AreA, blockiert damit dessen DNA-bindende Eigenschaften und kann so die Expression von ansonsten AreA-dereprimierten Genen inhibieren. In dem Phytopathogen *F. oxysporum*, einem Verwandten von *F. graminearum*, konnte dieser Regulationsweg ebenfalls nachgewiesen werden. Unter den Effektorgenen von MeaB in *F. oxysporum* befinden sich auch solche, deren Genprodukte den Pilz unter Stickstofflimitierung oder auf Nitrat als Stickstoffquelle befähigen, in Penetrationsassays Cellophanfolie zu penetrieren und das darunter liegende Medium zu kolonisieren. Wenn Ammonium die vorherrschende Stickstoffquelle war, konnte keine Penetration der Cellophanfolie festgestellt werden. Dieses Penetrationsverhalten konnte auch für *F. graminearum* und *M. oryzae* nachgewiesen (López-Berges *et al.*, 2010). Eine Deletion von *meaB* in *F. oxysporum* führte auf ammoniumhaltigem Medium zu einer teilweisen Derepression von NCR-Genen. So konnte die Δ *meaB*-Mutante in Penetrationsassays auf Medium mit Ammonium die Cellophanfolie penetrieren, während der WT dazu nicht in der Lage war (López-Berges *et al.*, 2010). Allerdings wurde in diesen Versuchen kein veränderter Wachstumsphänotyp von *F. oxysporum* auf Ammonium festgestellt oder dokumentiert. Die Ergebnisse von López-Berges *et al.* (2010) unterstreichen jedoch die Bedeutung dieses Regulationsweges für das Phytopathogen *F. oxysporum*. Zugleich geben sie den Hinweis darauf, dass auch die Virulenzfaktoren von *F. graminearum* in Abhängigkeit von der verfügbaren Stickstoffquelle reguliert werden.

4.7. Abschließende Betrachtung

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde in der Literatur nur eine ammoniumvermittelte Repression von Genen beschrieben, die unter Stickstofflimitierung oder auf Nitrat als Stickstoffquelle exprimiert werden. Die nun vorliegenden Ergebnisse geben einen sehr starken Hinweis darauf, dass auch die Expression der *TRI*-Clustergene einer Kontrolle von Regulationsfaktoren unterworfen ist, deren Aktivierung wiederum vom Ernährungszustand der Zelle abhängt. So konnte bewiesen werden, dass allein die Stickstoffspezies Ammonium zu einer Induktion des Virulenzfaktors DON in *F. graminearum* führt. Anhand der während dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und der aus der Literatur erworbenen Erkenntnisse über die Stickstoffregulation von Sekundärmetaboliten in anderen filamentösen Pilzen werden im Folgenden die möglichen Signaltransduktionsketten unter Ammonium- und Nitratbedingungen in *F. graminearum* zusammenfassend beschrieben. Dabei wird das Regulationsmodell aus Abb. 4.2 als Grundlage verwendet und leicht abgewandelt bzw. ergänzt.

Die Abbildung 4.3 zeigt eine potentielle Signaltransduktionskette in *F. graminearum* im Falle der Ammoniumverfügbarkeit. Unter Ammonium-Bedingungen könnte die GS mit der Ammonium-Permease MepB eine räumliche Interaktion eingehen, und neben der Aktivität als Enzym ebenfalls als ein interner Sensor fungieren. Dabei wird Ammonium (NH_4^+) über MepB aufgenommen und durch eine räumliche Interaktion direkt an die GS weitergeleitet. Dieses Enzym katalysiert unter Verwendung eines ATP die Kondensation von Glutamat mit Ammonium zu Glutamin. Von der GS ausgehend wird ein Signal auf noch nicht bekanntem Weg an die TOR-Kinase weitergeleitet. Diese Serin/Threonin-Proteinkinase ist die zentrale Schaltstelle der Zelle und koordiniert die Zellantwort auf verschiedene Nährstoffbedingungen. Von ihr geht sehr wahrscheinlich auch ein Signal aus, das über eine MAP-Kinase-Kaskade einen direkten Einfluss auf das Zellwachstum hat, was eine stark veränderte Hyphenmorphologie unter Ammonium bewirkt. Gleichzeitig kann TOR den positiven Transkriptionsfaktor AreA durch eine Phosphorylierung im Cytosol halten und verhindert damit eine Induktion spezifischer Gene (wie z.B.: *niaD*, *niaA*, *mepB*) im Zellkern. Abweichend von diesem Signalweg könnte ein zweiter, AreA-unabhängiger Signalweg über den Transkriptionsfaktor MeaB existieren. Seine Aktivierung ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, aber bei Ammoniumverfügbarkeit induziert er im Zellkern die Expression von NmrA, einem möglichen Inhibitor von AreA. Dies würde die beobachtete weitere Repression von NCR-Genen selbst bei inhibierter GS-Aktivität erklären. Der Signaltransduktionsweg, der bei der Verfügbarkeit von Ammonium letztlich zu der Induktion der Trichothecenbiosynthese führt, ist weiterhin nicht bekannt und

4. Diskussion

bedarf weiterer Nachforschungen.

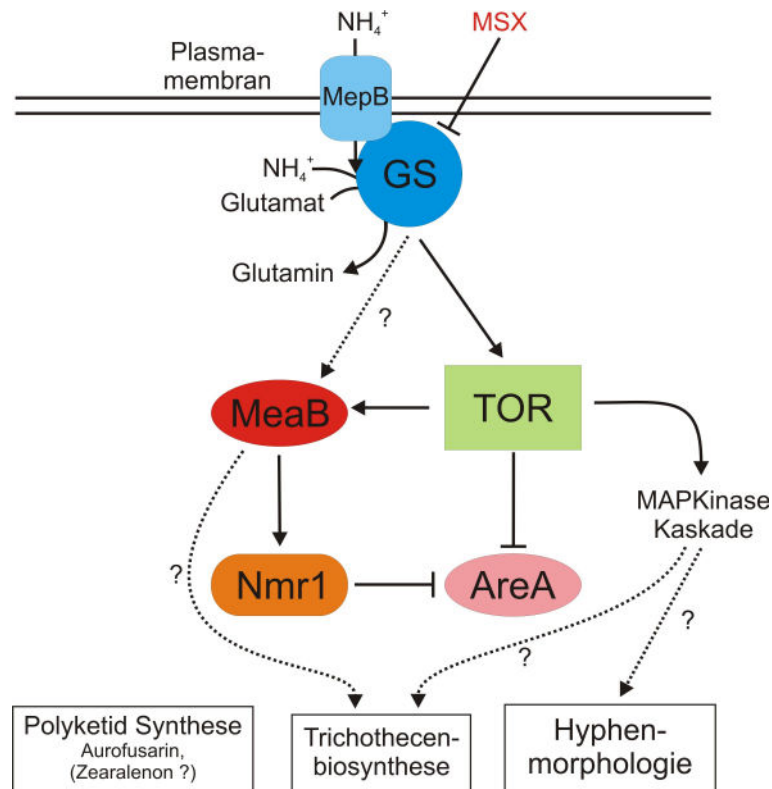


Abbildung 4.3.: Modifiziertes und stark vereinfachtes Modell der Signaltransduktion unter Ammonium-Bedingungen, erweitert und modifiziert nach López-Berges *et al.* (2010); Teichert *et al.* (2008, 2006). Die Verfügbarkeit von Ammonium führt möglicherweise zu einer Assoziation der Ammonium-Permease MepB mit der GS. Diese zeigt in Verbindung mit MepB, neben ihrer Tätigkeit als Enzym, eine Aktivität als Sensor und vermittelt ein Signal an TOR. Eine Aktivierung von TOR führt zu einer Arretierung von AreA im Cytosol der Zelle. Gleichzeitig verläuft ein Signal, von TOR ausgehend, wahrscheinlich über eine MAP-Kinase-Kaskade und nimmt Einfluss auf das Hyphenwachstum. Über den Transkriptionsfaktor MeaB wird die Transkription von *nmr1* induziert, dessen Genprodukt durch eine Interaktion mit AreA ebenfalls zu einer Hemmung dieses Transkriptionsfaktors führt. Durch die Inaktivität von AreA wird die Expression der Gene für die Polyketid-Synthese herunterreguliert. Die genauen Signaltransduktionswege, die zu der Aktivierung der *TRI*-Clustergene beitragen, sind noch nicht bekannt. Durch die Zugabe des GS-Inhibitors MSX kommt es zu einem Ausbleiben des Signals von der GS und damit zu einer Inhibierung der *TRI*-Clustergene und einer vermehrten Aurofusarinproduktion, auch unter Ammonium-Bedingungen.

Wenn Nitrat die Hauptquelle für Stickstoff darstellt, zeigt sich ein anderes Bild (Abb. 4.4). Das Ammonium für die Synthese von Glutamin stammt in diesem Fall aus der Reduktion von NO₃⁻ zu NH₄⁺ durch die Nitrat- und Nitritreduktase. Möglicherweise fehlt unter diesen Bedingungen eine Interaktion der GS mit MepB und es kommt nicht zu einer Signalweiterleitung an TOR. Damit fehlt das Signal für die „downstream“-liegenden Elemente. Da nun der Transkriptionsfaktor AreA nicht mehr über TOR phosphoryliert

4. Diskussion

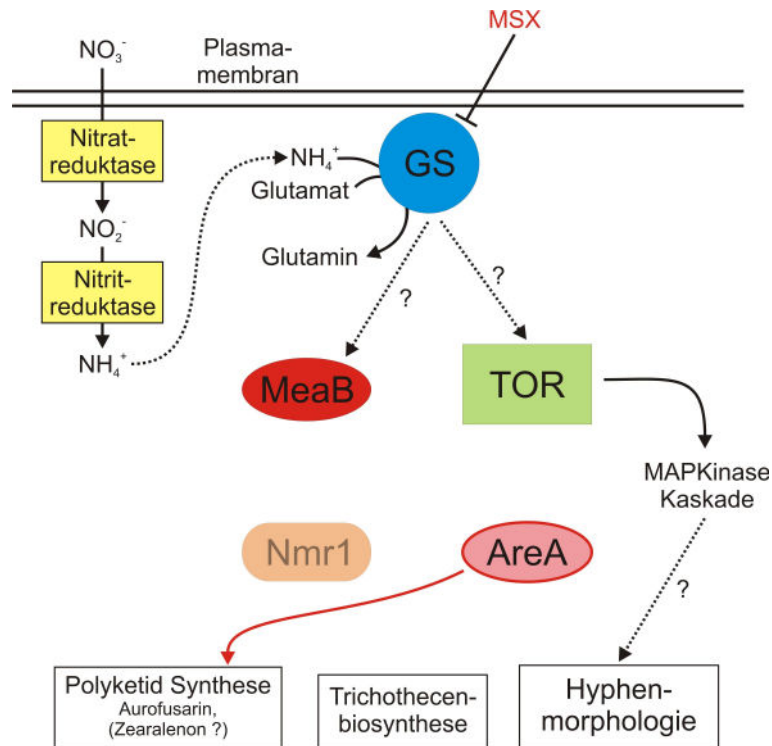


Abbildung 4.4.: Modifiziertes und stark vereinfachtes Modell der Signaltransduktion unter Nitrat-Bedingungen, erweitert und modifiziert nach López-Berges *et al.* (2010); Teichert *et al.* (2008, 2006). Unter nitratvorherrschenden Bedingungen fehlt möglicherweise die Assoziation der GS mit der Ammonium-Permease MepB. Dadurch fehlt das Eingangssignal für TOR, was zur Folge hat, dass der Transkriptionsfaktor AreA aktiv wird und im Zellkern die Expression seiner Effektorgene induzieren kann. Das Ammonium für die Synthese von Glutamin stammt unter diesen Bedingungen aus der Reduktion von Nitrat durch die Nitrat- und Nitritreduktase. Welche Rollen der zweite Transkriptionsfaktor MeaB und das AreA-inhibierende Protein Nmr1 unter Nitratbedingungen spielen, ist noch unbekannt.

und damit im Cytosol arretiert wird, kann er in den Kern wandern und dort die Expression spezifischer Gene induzieren. Eine gesteigerte rote Pigmentierung deutet bei *F. graminearum* auf eine erhöhte Produktion von Aurofusarin hin. Möglicherweise könnte auch die Synthese des Mykotoxins ZEA über diesen Signalweg reguliert werden, wobei diese These noch überprüft werden muss. Das lineare und kaum verzweigte Wachstum der Pilzhypen deutet ebenfalls auf einen veränderten Einfluss von TOR auf die Regulation des Zellwachstums unter Nitratbedingungen hin. Welche Rollen der zweite Transkriptionsfaktor MeaB oder das durch ihn induzierte AreA-bindende Protein Nmr1 unter Nitrat spielen, ist noch nicht bekannt. Auffällig ist jedoch, dass es unter Nitrat nicht zu einer Induktion der *TRI*-Clustergene kommt. Ob dies an einer fehlenden Induktion oder an einer aktiven Repression liegt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

4. Diskussion

Die Ergebnisse, die während der *in vitro*-Versuche gewonnen wurden, können möglicherweise auch das Verhalten des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes auf der Pflanze erklären. In der Karyopse und dem Rachisknoten konnte eine sehr starke GFP-Induktion festgestellt werden. Hier ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Aktivierung auf eine erhöhte Konzentration einer bevorzugten Stickstoffspezies wie Ammonium zurückgeht. Ob die entscheidenden Faktoren die Speicherproteine der Karyopse oder die amidigen Alkaloidverbindungen des Rachisknotens sind, müssen weitere Experimente klären. Das gradlinige und nicht induktive Wachstum des Reporterstammes in den Extrazellularen der Rachis könnte analog zu dem linearen und wenig verzweigten Wachstum unter Stickstofflimitierung oder auf Nitrat sein. Das intrazelluläre Wachstum zeigt dagegen eine starke Verzweigung und eine Induktion der Trichothecenbiosynthese, da innerhalb der Zelle sehr wahrscheinlich eine bessere Nährstoffversorgung des invasiv wachsenden Myzels vorliegt.

4.8. Ausblick

Ob und wie weit die Expression der *TRI5*-Clustergene von den beschriebenen Transkriptionsfaktoren AreA und MeaB abhängt, kann nur durch gezielte Deletionen ihrer kodierenden Gene beantwortet werden. Wird durch die Deletion eines dieser Gene die Produktion von DON und damit die Virulenz auf der Pflanze deutlich verändert, wäre erwiesen, dass die Regulation der Toxinproduktion tatsächlich der Kontrolle dieser Transkriptionsfaktoren unterliegt. Dass die Induktion des Virulenzfaktors DON nicht nur durch einen einzigen Signaltransduktionsweg erfolgt, zeigen die Versuche der Kultivierung auf verschiedenen Zuckern mit Ammonium als Stickstoffquelle. So hatte Saccharose einen anderen Einfluss auf die Expression von *TRI5* als Fructose (siehe Abb. 3.28 und 3.31). Dieses Ergebnis und auch die Versuche von Zhang und Wolf-Hall (2010) sowie Jiao *et al.* (2008) belegen einen möglichen Einfluss des CreA-Transkriptionsfaktors auf die Aktivierung dieses sekundären Stoffwechselmetabolits. Auch hier ist noch wenig über die Rolle dieses Signaltransduktionsweges in *F. graminearum* bekannt. Neben dem Ernährungszustand der Zelle spielen auch andere Faktoren, wie etwa der pH-Wert, eine Rolle. So konnten Gardiner *et al.* (2009b) zeigen, dass ein niedriger pH-Wert einen positiven Einfluss auf die DON-Produktion hat. In diesem Zusammenhang postulieren Caracuel *et al.* (2003), dass der pH-abhängige Transkriptionsfaktor PacC in *F. oxysporum* einen negativen Transkriptionsfaktor darstellt, der die säureabhängige Expression von Virulenzgenen verhindert. Ebenfalls in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Ochiai *et al.* (2007) zu nennen. Sie konnten zeigen, dass die Disruption einer Osmosensor-Histidin-Kinase ($\Delta fgos1$) eine vollkommen veränderte Expression des sekundären Stoffwechsels hatte, darunter auch eine veränderte Synthese von Aurofusarin und DON. Gerade die unterschiedliche Synthese des Pigments Aurofusarin auf verschiedenen Stickstoffquellen lässt die Frage zu, ob auch die Synthese des Toxins ZEA in der gleichen Art und Weise reguliert wird. Da beide Komponenten durch Polyketid-Synthasen synthetisiert werden, könnten sie auch einer ähnlichen Regulation unterworfen sein. Auch diesen Zusammenhang werden erst weitere Untersuchungen aufklären können.

Inwieweit die in dieser Arbeit beschriebenen Transkriptionsfaktoren und unterschiedlichen Signaltransduktionswege des Phytopathogens *F. graminearum* an der erfolgreichen Kolonisierung seiner Wirtspflanzen beteiligt sind, werden zukünftige mikroskopische und molekularbiologische Untersuchungen weiter aufklären können.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick in die Regulation der Trichothecenbiosynthese des filamentösen Askomyzeten *Fusarium graminearum* während des Wachstums auf der Wirtspflanze zu erlangen. Es gelang einen Fluoreszenzprotein-Reporterstamm zu klonieren, der sich durch eine konstitutive Expression des rotfluoreszierenden Proteins DsRed und eine *TRI5*-Promotor getriebene Expression des grünfluoreszierenden Proteins GFP auszeichnet. Somit war es möglich die Induktion der Trichothecenbiosynthese *in vivo* während des Verlaufs der Infektion auf Weizenähren zu verfolgen und durch Fluoreszenzmikroskopie zu dokumentieren. Zusätzlich zu diesen *in vivo*-Versuchen konnte ein Induktionsassay etabliert werden, in dem Minikulturen in 96-Lochplatten unter verschiedenen Bedingungen und unter dem Einfluss unterschiedlicher Substanzen angezogen und auf die Induktion des *TRI*-Genclusters untersucht wurden.

Während des Wachstums auf der Pflanze zeigte sich eine sehr starke Induktion des *TRI5*Prom.:GFP-Stammes in der Karyopse und im Rachisknoten. Dieser Bereich reagiert mit der Bildung von Zellwandverdickungen auf den Befall mit einer Toxin-defizienten $\Delta tri5$ -Mutante, wodurch diese in der inokulierten Ähre zurückgehalten wird. Die sehr hohe Induktion von *TRI5* in diesem Bereich deutet auf eine Antwort des eindringenden Reporterstammes auf die pflanzlich induzierte Abwehr hin. Die Proteinbiosynthese-inhibierenden Eigenschaften des pilzlichen Toxins Deoxynivalenol könnten wiederum die Pflanzenabwehr unterdrücken und so *F. graminearum* ermöglichen, die Ähre zu besiedeln. Die in den Induktionsassays getesteten Phenylpropanoidsäuren erwiesen sich nicht als Induktoren der Trichothecenbiosynthese, sondern inhibierten stark das Wachstum des Pilzes. Bis auf ammoniumhaltige Salze erwiesen sich alle anderen getesteten Komponenten ebenfalls als nicht relevant für die Induktion der *TRI5*-Expression. Durch die Isolierung von Rohextrakten aus infizierten Rachisknoten und deren Verwendung in den Induktionsassays konnte gezeigt werden, dass der *TRI5*-induzierende Faktor *de novo* durch die Pflanzenabwehr gebildet wird. In HPLC/MS-Messungen konnte jedoch lediglich eine erhöhte Konzentration des Lignin-Vorläufers *p*-Cumarinsäure eindeutig identifiziert werden. Neben diesen Rohextrakten konnte auch mit den alkoholischen Extrakten aus Weizen- und Maismehl eine sehr hohe Induktion der Trichothecenbiosynthese in den Induktionsassays nachgewiesen werden. Bei diesen Extraktionen wurden die in wässrigem Alkohol löslichen Speicherproteine aufkonzentriert. Diese zeichnen sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung durch einen besonders hohen Anteil an Glutamin und Glycin aus. Die Induktion der

5. Zusammenfassung

Trichothecenbiosynthese durch Ammoniumsulfat als auch durch diese Aminosäuren ergab den Hinweis, dass die Toxinproduktion in *F. graminearum* abhängig von der verfügbaren Stickstoffspezies reguliert wird. Kulturen des Reporterstammes auf Agarplatten, deren einzige Stickstoffquelle Ammonium war, zeigten ebenfalls eine sehr starke Induktion des *TRI5*Promotor-GFP-Konstruktes. Wurde Nitrat als Stickstoffquelle eingesetzt, kam es dagegen nicht zu einer Induktion der Toxinproduktion. Neben der Induktion der Toxinproduktion durch Ammonium zeigte sich auch ein stark verändertes Hyphenwachstum. Das Myzel war in seinem Längenwachstum deutlich eingeschränkt und wies eine sehr starke Verzweigung der einzelnen Hyphen auf. Durch die Zugabe des Glutamin-Synthetase-Inhibitors L-Methionin-DL-Sulfoximin konnte sowohl die *TRI5*-Expression und Toxinproduktion herabgesetzt als auch das eingeschränkte Hyphenwachstum rückgängig gemacht werden. Dies deutet auf eine mögliche sensorische Aktivität der Glutamin-Synthetase und einen direkten Einfluss dieses Enzyms auf die stickstoffabhängige Regulation von Genen in *F. graminearum* hin. Diese Arbeit kann zum ersten Mal nachweisen, dass ein Virulenzfaktor von *F. graminearum* durch die Verfügbarkeit der bevorzugten Stickstoffquelle Ammonium induziert wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation der Virulenzfunktionen in *F. graminearum* ähnlich zu den bekannten Regulationsmechanismen in *F. oxysporum* und *F. fujikuroi* ist.

Literaturverzeichnis

- Amberg, D. C., Botstein, D., und Beasley, E. M. (1995). Precise gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* by double fusion polymerase chain reaction. *Yeast*, 11(13):1275–1280.
- Apel, K. und Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373.
- Audenaert, K., Callewaert, E., Höfte, M., Saeger, S. D., und Haesaert, G. (2010). Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. *BMC Microbiol*, 10:112.
- Bai, G., Desjardins, A., und Plattner, R. (2001). Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* Causes Initial Infection, but does not Cause Disease Spread in Wheat Spikes. *Mycopathologia*, 153(2):91–98.
- Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogène, B. J. R., und Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J Agric Food Chem*, 51(9):2826–2831.
- Barceló, A. und Laura, V. (2009). Reactive Oxygen Species in Plant Cell Walls. *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*, pages 73–93.
- Beck, T. und Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762):689–692.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Savard, M. E., Reddy, R., Blackwell, B. A., Campbell, C. M., Krantis, A., Durst, T., Philogène, B. J. R., Arnason, J. T., und Regnault-Roger, C. (2004). Analysis of *Fusarium graminearum* mycotoxins in different biological matrices by LC/MS. *Mycopathologia*, 157(1):117–126.
- Biswas, K. und Morschhäuser, J. (2005). The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*, 56(3):649–669.

Literaturverzeichnis

- Boenisch, M. J. (2009). Untersuchung der Toxin-Induktion von *Fusarium graminearum* während der frühen Infektionsstadien auf Weizenblüten. Diplomarbeit, Universität Hamburg, Department Biologie, Biozentrum Klein-Flottbek.
- Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2(4):287–294.
- Boutigny, A., Atanasova-Pénichon, V., Benet, M., Barreau, C., und Richard-Forget, F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *Eur J Plant Pathol*, 127:275–286.
- Boutigny, A.-L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.-N., Pinson-Gadais, L., und Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res*, 113(Pt 6-7):746–753.
- Boyacioglu, D. und Hettiarachchy, N. (1995). Changes in some biochemical components of wheat grain that was infected with *Fusarium graminearum*. *Journal of Cereal Science*, 21(1):57–62.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P., und Lamb, C. J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70(1):21–30.
- Branlard, G. und Bancel, E. (2007). Protein extraction from cereal seeds. *Methods Mol Biol*, 355:15–25.
- Brown, N., Urban, M., van de Meene, A., und Hammond-Kosack, K. (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, 114:555–571.
- Buckingham, J. (2000). *Dictionary of Natural Products on DVD*. Chapman and Hall/CRC.
- Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., García-Maceira, F. I., und Pietro, A. D. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol*, 48(3):765–779.
- Chen, L., McCormick, S. P., und Hohn, T. M. (2000). Altered regulation of 15-acetyldeoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*. *Appl Environ Microbiol*, 66(5):2062–2065.

Literaturverzeichnis

- Covarelli, L., Turner, A., und Nicholson, P. (2004). Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of *Tri* genes in *Fusarium culmorum* by fungicides *in vitro*. *Plant Pathology*, 53(1):22–28.
- Crespo, J. L. und Hall, M. N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(4):579–591.
- Crespo, J. L., Powers, T., Fowler, B., und Hall, M. N. (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(10):6784–6789.
- de Ascensao, A. R. F. D. C. und Dubery, I. A. (2003). Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry*, 63(6):679–686.
- Dechant, R. und Peter, M. (2008). Nutrient signals driving cell growth. *Curr Opin Cell Biol*, 20(6):678–687.
- den Ackerveken, G. F. V., Dunn, R. M., Cozijnsen, A. J., Vossen, J. P., den Broek, H. W. V., und Wit, P. J. D. (1994). Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Gen Genet*, 243(3):277–285.
- Desjardins, A., Proctor, R., Bai, G., McCormick, S., Shaner, G., Buechley, G., und Hohn, T. (1996). Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Mol Plant Microbe Interact*, 9:775–781.
- Desjardins, A. E. (2009). From yellow rain to green wheat: 25 years of trichothecene biosynthesis research. *J Agric Food Chem*, 57(11):4478–4484.
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M., und McCormick, S. P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev*, 57(3):595–604.
- Díez, B., Gutiérrez, S., Barredo, J. L., van Solingen, P., van der Voort, L. H., und Martín, J. F. (1990). The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the α -aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcbC* and *penDE* genes. *J Biol Chem*, 265(27):16358–16365.
- Divon, H., Ziv, C., Davydov, O., Yarden, O., und Fluhr, R. (2006). The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 7(6):485–497.

Literaturverzeichnis

- Divon, H. H. und Fluhr, R. (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiol Lett*, 266(1):65–74.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839):843–847.
- Dowzer, C. E. und Kelly, J. M. (1991). Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol*, 11(11):5701–5709.
- Drysdale, M. R., Kolze, S. E., und Kelly, J. M. (1993). The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene*, 130(2):241–245.
- Edreva, A., Velikova, V., und Tsonev, T. (2007). Phenylamides in plants. *Russ J Plant Physiol*, 54(3):287–301.
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M., und Rotstein, S. H. (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim Biophys Acta*, 1477(1-2):122–145.
- Evans, C. K., Xie, W., Dill-Macky, R., und C.J., M. (2000). Biosynthesis of Deoxynivalenol in Spikelets of Barley Inoculated with Macroconidia of *Fusarium graminearum*. *Am Phytopath Society*, 84(6):654–660.
- Frandsen, R. J. N., Nielsen, N. J., Maolanon, N., Sørensen, J. C., Olsson, S., Nielsen, J., und Giese, H. (2006). The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Mol Microbiol*, 61(4):1069–1080.
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2):334–361.
- Gardiner, D. M., Kazan, K., und Manners, J. M. (2009a). Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*, 46(8):604–613.
- Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K., und Manners, J. M. (2009b). Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 155:3149–3156.
- Geissman, T., Verbiscar, A., Phinney, B., und Cragg, G. (1966). Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 5(5):933–947.

Literaturverzeichnis

- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R., und Kriek, N. P. (1988). Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*, 54(7):1806–1811.
- Giordano, W., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E., und Domenech, C. (1999). Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters*, 173(2):389–394.
- Gómez-Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J. R., und Cooper, R. M. (2004). Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Ann Bot (Lond)*, 94(1):87–97.
- Goswami, R. und Kistler, H. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol*, 5(6):515–525.
- Guenther, J. C. und Trail, F. (2005). The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, 97(1):229–237.
- Halford, N. und Shewry, P. (2007). The structure and expression of cereal storage protein genes. *Endosperm*, 8:195–218.
- Harris, L., Desjardins, A., Plattner, R., Nicholson, P., Butler, G., Young, J., Weston, G., Proctor, R., und Hohn, T. (1999). Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. *Plant Disease*, 83(10):954–960.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol*, 45:101–127.
- Hohn, T. M. und Desjardins, A. E. (1992). Isolation and gene disruption of the *Tox5* gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 5(3):249–256.
- Holding, D. und Larkins, B. (2008). Zein Storage Proteins. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*, 63:269–286.
- Homdork, S., Fehrmann, H., und Becks, R. (2000). Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of *Fusarium*-infected wheat grain. *J Phytopathol*, 148(1):7–15.

Literaturverzeichnis

- Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y., und Ueno, Y. (1983). Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, 46(6):1364–1369.
- Ilgen, P., Haderler, B., Maier, F. J., und Schäfer, W. (2009). Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 22(8):899–908.
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., und 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 U S A*, 102(46):16892–16897.
- Javelle, A., Thomas, G., Marini, A.-M., Krämer, R., und Merrick, M. (2005). *In vivo* functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. *Biochem J*, 390(Pt 1):215–222.
- Jiao, F., Kawakami, A., und Nakajima, T. (2008). Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett*, 285:212–219.
- Johansson, E., Oscarson, P., Heneen, W. K., und Lundborg, T. (1994). Differences in accumulation of storage proteins between wheat cultivars during development. *J. Sci. Food Agric.*, 64(3):305–313.
- Kang, Z. und Buchenauer, H. (2000). Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiol Mol Plant P*, 57(6):255–268.
- Kim, J. H., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., und Campbell, B. C. (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70(6):735–739.
- Kim, Y.-T., Lee, Y.-R., Jin, J., Han, K.-H., Kim, H., Kim, J.-C., Lee, T., Yun, S.-H., und Lee, Y.-W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol*, 58(4):1102–1113.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., und Fujimura, M. (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(9):2105–2123.

Literaturverzeichnis

- Klepacka, J. und Fornal, L. (2006). Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(8):639–647.
- Kudla, B., Caddick, M., Langdon, T., Martinez-Rossi, N., Bennett, C., Sibley, S., Davies, R., und Arst Jr, H. (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal*, 9(5):1355.
- Leach, J., Lang, B. R., und Yoder, O. C. (1982). Methods for Selection of Mutants and *In Vitro* Culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *J Gen Microbiol*, 128(8):1719–1729.
- Lee, J., Lee, T., Lee, Y.-W., Yun, S.-H., und Turgeon, B. G. (2003). Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol*, 50(1):145–152.
- Lemmens, M., Haim, K., Lew, H., und Ruckebauer, P. (2004). The effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat. *J Phytopathol*, 152(1):1–8.
- Liaw, S. H., Pan, C., und Eisenberg, D. (1993). Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine, and serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(11):4996–5000.
- Limjindaporn, T., Khalaf, R. A., und Fonzi, W. A. (2003). Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by *GAT1*. *Mol Microbiol*, 50(3):993–1004.
- Linnemannstöns, P., Schulte, J., del Mar Prado, M., Proctor, R. H., Avalos, J., und Tudzynski, B. (2002). The polyketide synthase gene *pk_{s4}* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genet Biol*, 37(2):134–148.
- López-Berges, M. S., Rispaill, N., Prados-Rosales, R. C., und Pietro, A. D. (2010). A Nitrogen Response Pathway Regulates Virulence Functions in *Fusarium oxysporum* via the Protein Kinase TOR and the bZIP Protein MeaB. *Plant Cell*, 22:2459–2475.
- Maier, F., Miedaner, T., Hadel, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H., und Schäfer, W. (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. *Mol Plant Pathol*, 7(6):449–461.

Literaturverzeichnis

- Maier, F. J., Malz, S., Lösch, A. P., Lacour, T., und Schäfer, W. (2005). Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker. *FEMS Yeast Res*, 5(6-7):653–662.
- Malz, S., Grell, M. N., Thrane, C., Maier, F. J., Rosager, P., Felk, A., Albertsen, K. S., Salomon, S., Bohn, L., Schäfer, W., und 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):420–433.
- Marasas, W., Nelson, P., und Toussoun, T. (1984). *Toxigenic Fusarium species, identity and mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press University Park, PA.
- Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(1):17–32.
- McKeehen, J. D., Busch, R. H., und Fulcher, R. G. (1999). Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *J Agric Food Chem*, 47(4):1476–1482.
- Mehdy, M. C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol*, 105(2):467–472.
- Menden, B., Kohlhoff, M., und Moerschbacher, B. M. (2007). Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry*, 68(4):513–520.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., und Schilling, A. (2000). Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107(2):124–134.
- Mikkelsen, L., Sarrocco, S., Lübeck, M., und Jensen, D. F. (2003). Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiol Lett*, 223(1):135–139.
- Miller, J. und Greenhalgh, R. (1985). Nutrient effects on the biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia*, 77(1):130–136.
- Miller, J., Taylor, A., und Greenhalgh, R. (1983). Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Can J Microbiol*, 29(9):1171–1178.

Literaturverzeichnis

- Muñoz, G. A. und Agosin, E. (1993). Glutamine Involvement in Nitrogen Control of Gibberellic Acid Production in *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol*, 59(12):4317–4322.
- Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y., und Tsuge, T. (2001). Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(4):580–584.
- Nganje, W., Johnson, D., Wilson, W., Leistriz, F., Bangsund, D., und Tiapo, N. (2001). Economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley: 1998-2000. *Agribusiness & Applied Economics-Report No. 464*.
- Nguyen, N. L. (2008). *Importance of secreted lipases for virulence of the phytopathogenic fungus Fusarium graminearum*. Dissertation, Department Biologie, Universität Hamburg.
- Nirenberg, H. I. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can J Bot*, 59:1599–1609.
- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., und Kimura, M. (2007). Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(3):639–644.
- Ospina-Giraldo, M. D., Mullins, E., und Kang, S. (2003). Loss of function of the *Fusarium oxysporum* *SNF1* gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Curr Genet*, 44(1):49–57.
- Pan, X., Harashima, T., und Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, 3(6):567–572.
- Polley, S. D. und Caddick, M. X. (1996). Molecular characterisation of *meaB*, a novel gene affecting nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett*, 388(2-3):200–205.
- Ponts, N., Couedelo, L., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.-N., Barreau, C., und Richard-Forget, F. (2009). *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS Microbiol Lett*, 293(2):255–262.

Literaturverzeichnis

- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., und Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Lett*, 581(3):443–447.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M.-N., Barreau, C., und Richard-Forget, F. (2006). Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett*, 258(1):102–107.
- Pérez-García, A., Snoeijers, S. S., Joosten, M. H., Goosen, T., und Wit, P. J. D. (2001). Expression of the Avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(3):316–325.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., und McCormick, S. P. (1995a). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Mol Plant Microbe Interact*, 8(4):593–601.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P., und Desjardins, A. E. (1995b). *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol*, 61(5):1923–1930.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H., und van den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56(1):117–124.
- Reddy, M. V. B., Arul, J., Angers, P., und Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J Agric Food Chem*, 47(3):1208–1216.
- Rhee, S. (1999). Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & Molecular Medicine*, 31(2):53.
- Rocha, O., Ansari, K., und Doohan, F. M. (2005). Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit Contam*, 22(4):369–378.
- Rodríguez-Ortiz, R., Limón, M. C., und Avalos, J. (2009). Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants. *Appl Environ Microbiol*, 75(2):405–413.

Literaturverzeichnis

- Rohde, J., Heitman, J., und Cardenas, M. E. (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem*, 276(13):9583–9586.
- Rohde, J. R., Bastidas, R., Puria, R., und Cardenas, M. E. (2008). Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, 11(2):153–160.
- Ronzio, R., Rowe, W., und Meister, A. (1969). Mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry*, 8(3):1066–1075.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., *et al.* (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, 2 edition.
- Santiago, R., Reid, L. M., Arnason, J. T., Zhu, X., Martinez, N., und Malvar, R. A. (2007). Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to Gibberella stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). *J Agric Food Chem*, 55(13):5186–5193.
- Schmelzle, T. und Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2):253–262.
- Schrödter, R. (2004). Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. *Toxicol Lett*, 153(1):47–49.
- Screen, S., Bailey, A., Charnley, K., Cooper, R., und Clarkson, J. (1997). Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Curr Genet*, 31(6):511–518.
- Shetty, N., Jørgensen, H., Jensen, J., Collinge, D., und Shetty, H. (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 121(3):267–280.
- Shewry, P. R. und Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot*, 53(370):947–958.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., und Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 357(1418):133–142.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., und Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 7(7):945–956.

Literaturverzeichnis

- Shifrin, V. I. und Anderson, P. (1999). Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem*, 274(20):13985–13992.
- Skerritt, J., Lew, P., und Castle, S. (1988). Accumulation of gliadin and glutenin polypeptides during development of normal and sulphur-deficient wheat seed: analysis using specific monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Botany*, 39(6):723.
- Snoeijsers, S., Pérez-García, A., Joosten, M., und De Wit, P. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 106(6):493–506.
- Strange, R., Majer, J., und Smith, H. (1974). The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiol Plant Pathol*, 4(2):277–290.
- Strange, R. und Smith, H. (1971). A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiol Plant Pathol*, 1(2):141–144.
- Strange, R. N. (1998). Plants under attack II. *Sci Prog*, 81 (Pt 1):35–68.
- Sutton, J. (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can J Plant Pathol*, 4:195–209.
- Tatham, A. S. und Shewry, P. R. (2008). Allergens to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy*, 38(11):1712–1726.
- Teichert, S., Rutherford, J. C., Wottawa, M., Heitman, J., und Tudzynski, B. (2008). Impact of ammonium permeases MepA, MepB, and MepC on nitrogen-regulated secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell*, 7(2):187–201.
- Teichert, S., Schönig, B., Richter, S., und Tudzynski, B. (2004). Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. *Mol Microbiol*, 53(6):1661–1675.
- Teichert, S., Wottawa, M., Schönig, B., und Tudzynski, B. (2006). Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism. *Eukaryot Cell*, 5(10):1807–1819.
- Trail, F. (2009). For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiol*, 149(1):103–110.

Literaturverzeichnis

- Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B., und Marzluf, G. A. (1999). Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet*, 261(1):106–114.
- Tudzynski, B., Liu, S., und Kelly, J. M. (2000). Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea creA* genes. *FEMS Microbiol Lett*, 184(1):9–15.
- van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., und Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem*, 389(1):147–157.
- Vit, M. J. D., Waddle, J. A., und Johnston, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the *Mig1* glucose repressor. *Mol Biol Cell*, 8(8):1603–1618.
- Voigt, C., von Scheidt, B., Gacser, A., Kassner, H., Lieberei, R., Schäfer, W., und Salomon, S. (2007). Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *Eur J Plant Pathol*, 117(1):1–12.
- Voigt, C. A., Schäfer, W., und Salomon, S. (2005). A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J*, 42(3):364–375.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H.-U., und Tudzynski, B. (2009). Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol*, 72(4):931–946.
- Wong, K. H., Hynes, M. J., Todd, R. B., und Davis, M. A. (2007). Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 66(2):534–551.
- Wray, L. V., Zalieckas, J. M., und Fisher, S. H. (2001). *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell*, 107(4):427–435.
- Yu, J., Bhatnagar, D., und Cleveland, T. E. (2004). Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Lett*, 564(1-2):126–130.
- Zhang, H. und Wolf-Hall, C. (2010). The effect of different carbon sources on phenotypic expression by *Fusarium graminearum* strains. *Eur J Plant Pathol*, 127(1):137–148.

Literaturverzeichnis

Zörb, C., Grover, C., Steinfurth, D., und Mühling, K. (2010). Quantitative proteome analysis of wheat gluten as influenced by N and S nutrition. *Plant and Soil*, 327(1):225–234.

6. Abkürzungsverzeichnis

15-ADON	15-Acetyldeoxynivalenol
3-ADON	3-Acetyldeoxynivalenol
4-ANIV	4-Acetylnivalenol
AS	Ammoniumsulfat
bp	Basenpaare
CCR	carbon catabolite repression, Kohlenstoff-Katabolit-Repression
cDNA	kodierende DNA
CH	Cyclohexan
Chl	Chloroform
CM	Komplettmedium
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Kultivar
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DON	Deoxynivalenol
dpi	"days post inoculation", Tage nach Infektion
DsRed	rot fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FHB	<i>Fusarium</i> Head Blight, <i>Fusarium</i> -Ährenbleiche
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GS	Glutamin-Synthetase
GYEP	Glucose/Yeast-Extract/Peptone-Medium
MM	Minimalmedium

6. Abkürzungsverzeichnis

MNS	Spurenelementlösung
mRNA	Messenger RNA
MSX	L-Methionin-DL-Sulfoximin
n.d.	nicht detektierbar
NCR	nitrogen catabolite repression, Stickstoff-Katabolit-Repression
NIV	Nivalenol
N-Quellen	Stickstoffquellen
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
Rap	Rapamycin
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit
RT-PCR	Reverse Transkription - PCR
SDS	Natrium Dodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamide-Gelelectrophoresis
SNA	Synthetic Nutrient Poor Medium
TDI	tolerable daily intake
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
ZEA	Zearalenon

A. Anhang

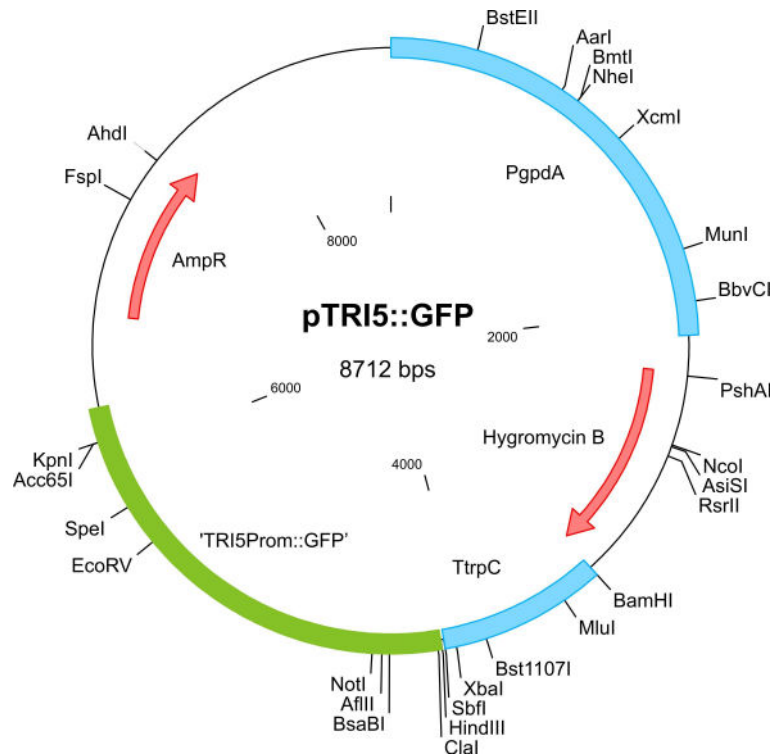


Abbildung A.1.: Plasmidkarte von pTRI5GFP. Dieses Plasmid wurde für die erste Transformation verwendet. Es wurde in der *TRI5*-Promotor-Sequenz mit dem Restriktionsenzym *Acc65I* geöffnet und in den *F. graminearum*-Wildtypstamm *Fg 8/1* homolog integriert. Das Plasmid trägt die *gpdA*-Promotor getriebene Hygromycinresistenz sowie das *TRI5*-Promotor-GFP-Fusionskonstrukt.

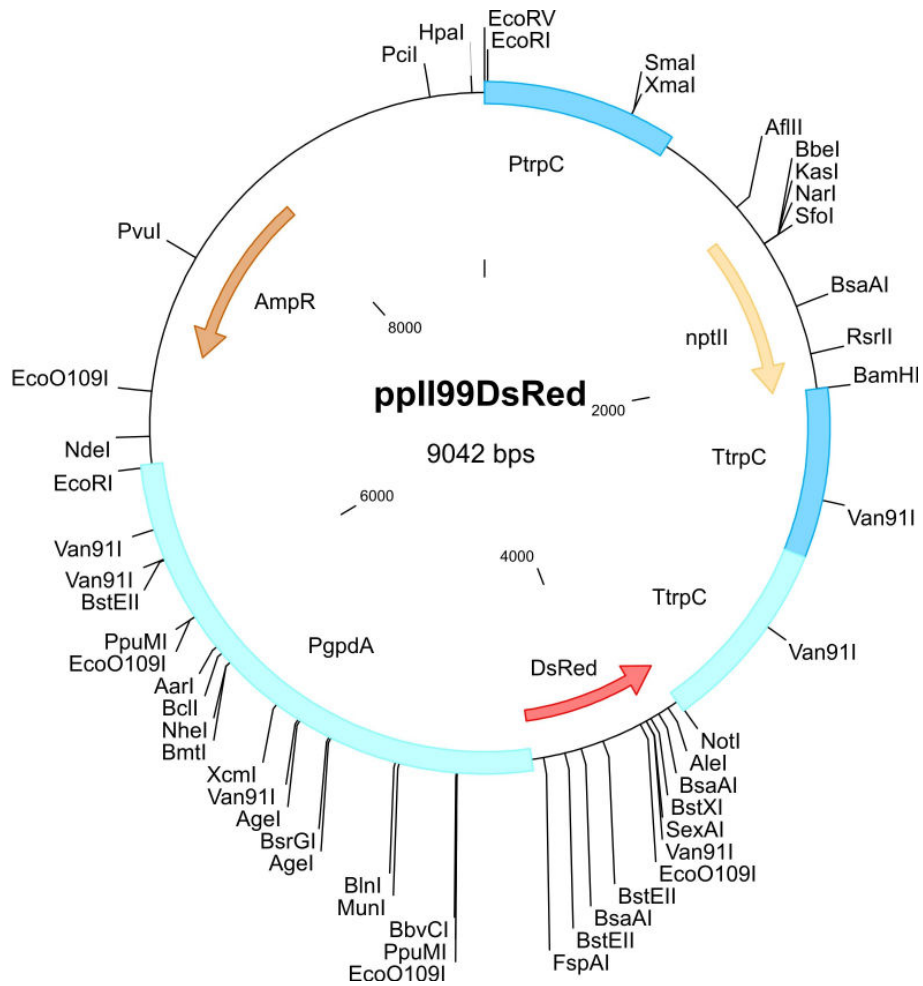


Abbildung A.2.: Plasmidkarte von pII99DsRed. Dieses Plasmid wurde verwendet, um den zusätzlichen Fluoreszenzmarker DsRed in das bereits vorhandene Plasmidrückgrat von pTRI5GFP zu transformieren. Dazu wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *PvuI* in der *amp*-Sequenz geöffnet.

Tabelle A.1.: Primersequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primername	Sequenz	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemperatur [°C]
PI-Tri5fwd	ATGACTACCCCTCAAATTCCTTCGT	451	58,5
PI-Tri5rev	GAACTTCTTGGCGTCCTCTG		58,5
PI-Tri4fwd	GTACCCGTTATCCTGTTTGCTG	464	57,5
PI-Tri4rev	CAAAGGCCATAGTGTATCCGA		57,5
PI-Tri6fwd	AGACTTTGTACTCCGAAGAACCA	382	59,5
PI-Tri6rev	TTGTCCTTCCCTTGCTTTGCCA		59,5
PI-Tri10fwd	GACCTCAITCACTCAGATTTACGCC	306	61
PI-Tri10rev	CTCTTCTCTTCCAAGCGTCTTCC		61
PI-GFP2fwd	TCITCAAAGTCGGCCATGCC	453	62,5
PI-GFP2rev	TCCATGCCGTGAGTGATCCC		62,5
PI-Betatubfwd	CCCAACAACCGTCCAAAACCTTC	195	61
PI-Betatubrev	CCTCGGTGAATTCATCTCGTC		61
PI-DsRedfwd	CGAGGACGTCATCAAGGAGT		58
PI-DsRedrev	GCCGATGAACCTCACCTTGT		58
Tri5Prom-fwd	GTACTCTGTACAGAGTACTTCGTCGA	Klonierung des Tri5PromotorFragments	
Tri5-rev	AGGCTGAGCAAAAGTGGTGGGGAG		
Tri5-GFP-fwd	<i>TTTGCACTATGCTTACAACAAGGCTGCCACCACCTTTGCTCAGCCTGTGAGCAAGGGCGGAGGAGG</i> TGTCAAC ^a		
GFP-HindIII	<i>CCCAAGCTTGGGGGTGACGGGTATCGATAAGA</i> ^b		

^aBasen in kursiv sind homolog zu *TR15*-Sequenz^bBasen in kursiv sind *HindIII*-Erkennungssequenz

A. Anhang

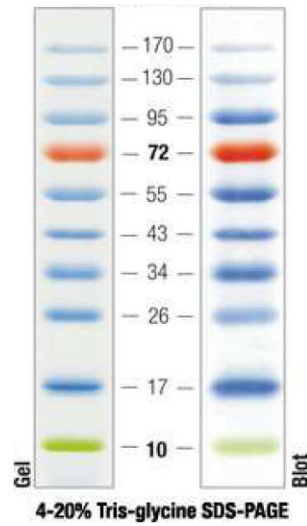


Abbildung A.3.: Abbildung des verwendeten Proteinmarkers „peqGOLD Prestained Protein-Marker IV“ der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland). Dieser Marker zeichnet sich durch seine schon vorgefärbten Proteinbanden aus, die sowohl im Gel als auch auf dem Western Blot sichtbar werden.

A. Anhang

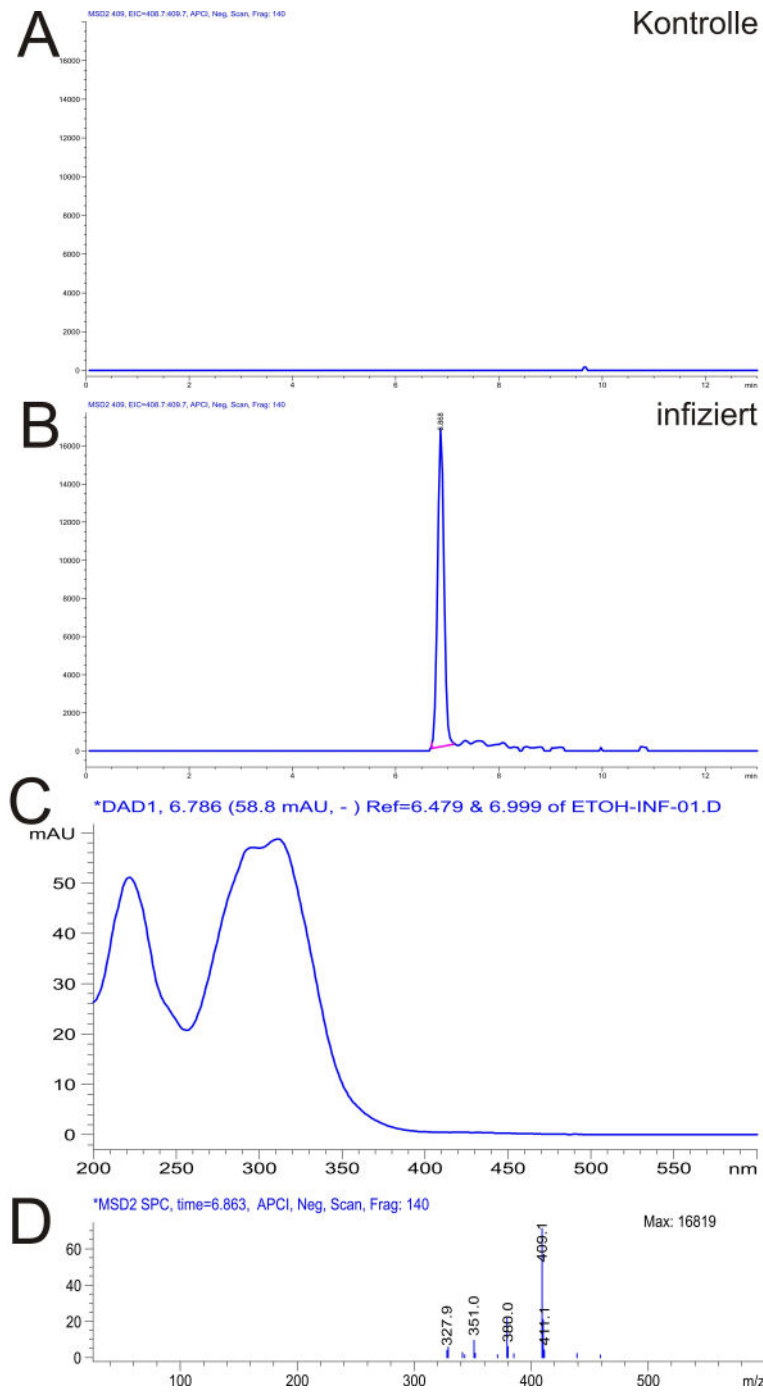


Abbildung A.4.: Ionenchromatogramm, UV-Spektrum und Massenspektrum des Peaks II aus Abb. 3.19.

A. Anhang

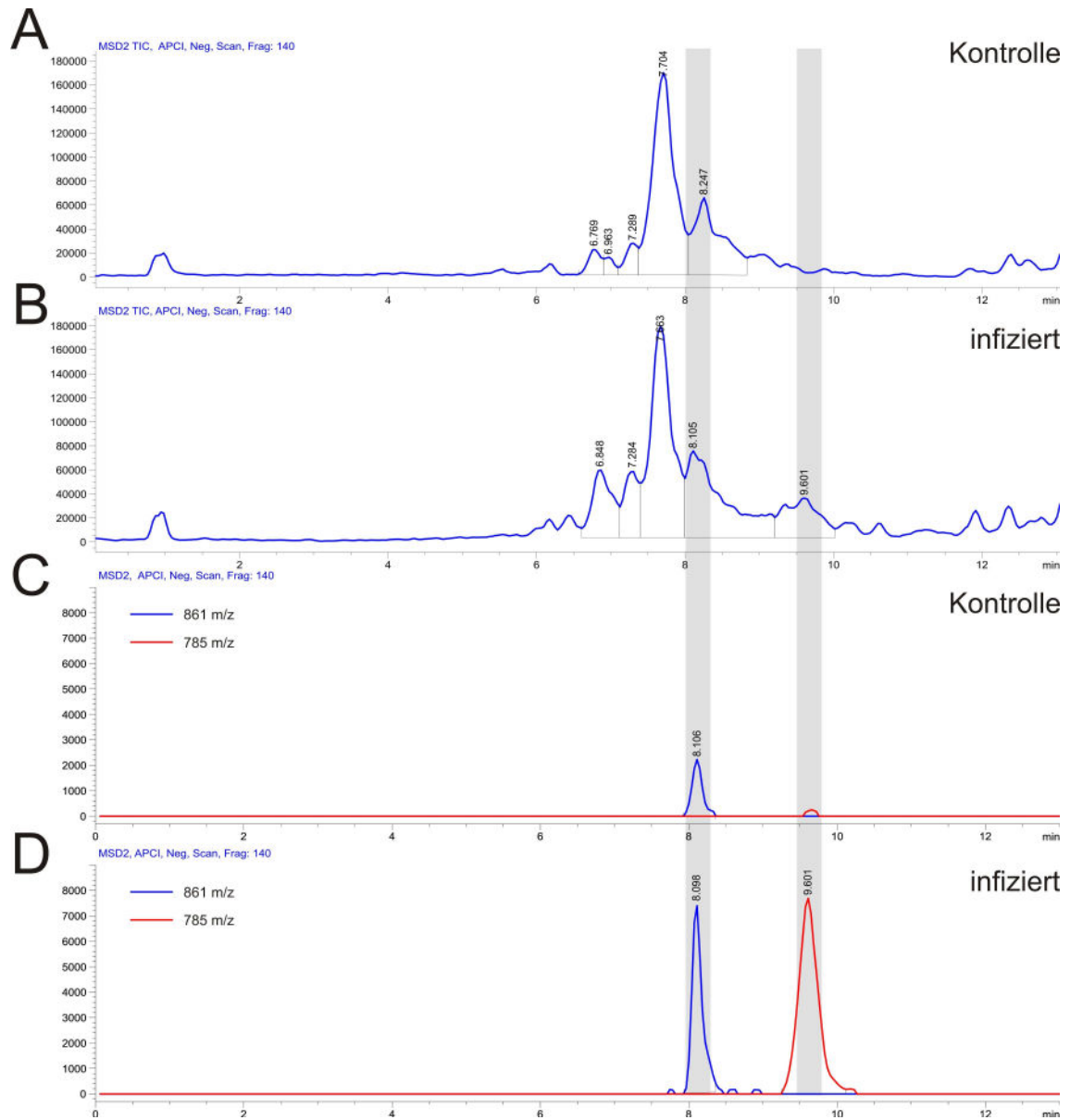


Abbildung A.5.: Ionenchromatogramme der Extrakte aus infizierten Ähren und der Kontrolle, korrelieren mit den UV-Spektren in Abb. 3.19

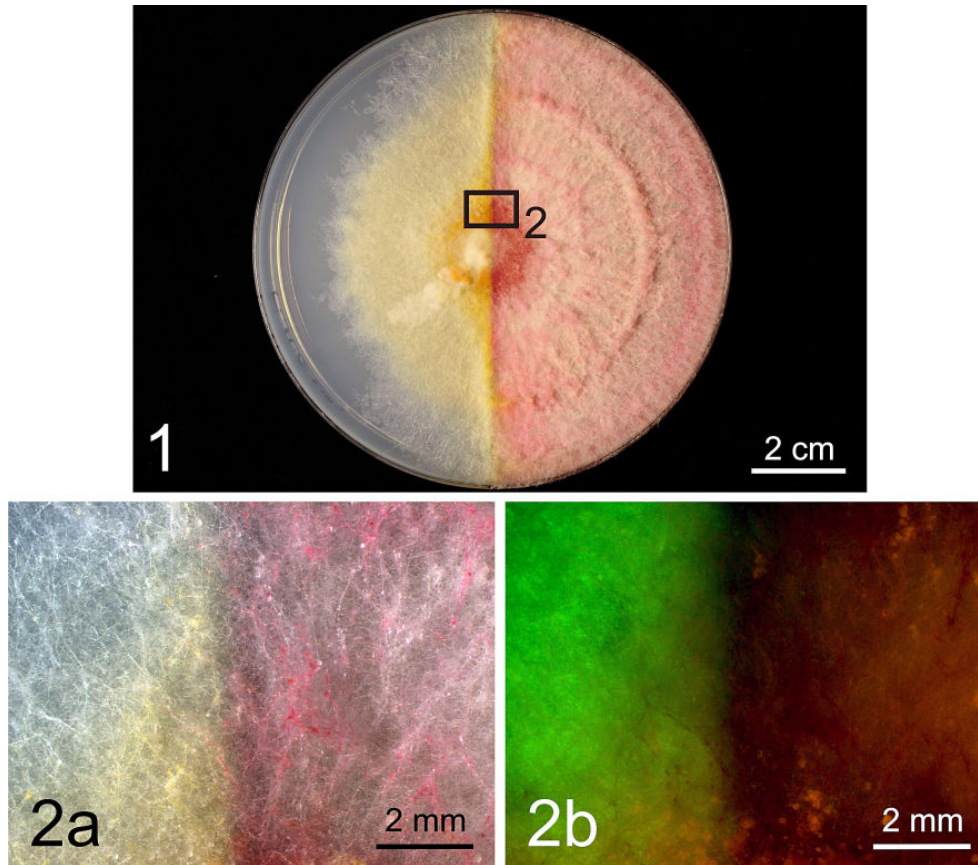


Abbildung A.6.: Phänotyp des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes auf MM_{mod} -Agar mit Ammonium und Nitrat (je 5 mM) als N-Quelle, 5 dpi. **1** Geteilte Petrischale. Das linke Kompartiment wurde mit MM_{mod} mit 5 mM Ammoniumsulfat, das rechte Kompartiment mit MM_{mod} mit 5 mM Calciumnitrat befüllt. Dabei wurde ein so großes Volumen eingefüllt, dass sich beide Medien oberhalb des Steges berühren. Anschließend wurde die Mitte der Agarplatte mit 1000 Konidien des *TRI5*Prom::GFP-Reporterstammes inokuliert. Es zeigt sich der bereits beschriebene Wachstumspheänotyp auf den unterschiedlichen Stickstoffquellen (Abb. 3.24 und 3.25). **2a** - **2b** zeigen eine Vergrößerung aus **1**. **2a** zeigt eine Weißlichtaufnahme des Myzels im Übergangsbereich. Auffällig ist hier, dass die Färbung des Myzels auf der linken Seite (5 mM AS) sehr schwach ist, während die rechte Seite (5 mM $CaNO_3$) sehr stark rot gefärbt ist. **2b** zeigt die selbe Stelle unter GFP Plus-Fluoreszenzbedingungen. Während auf der linken Seite das Myzel fast vollständig eine Induktion von *TRI5*Prom::GFP zeigt, ist auf der rechten Seite nur die konstitutive DsRed-Fluoreszenz zu beobachten.

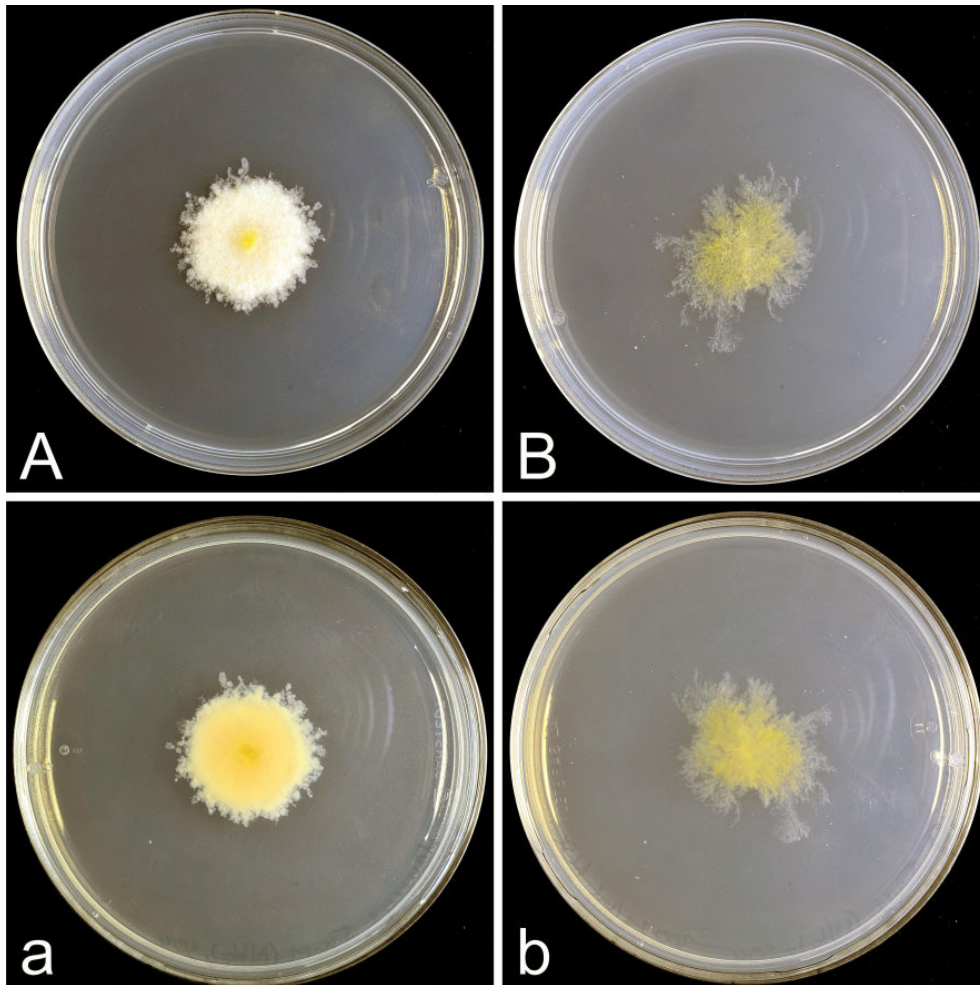


Abbildung A.7.: Myzelwachstum auf $MM_{mod.}$ mit 5 mM AS sowie 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSX, 5 dpi. **A** Wachstum des Myzels auf 5 mM AS, Oberseite der Agarplatte; **a** Unterseite der Agarplatte. Die Kolonie zeigt den typischen Wachstumsphänotyp auf ammoniumhaltigem Medium: Stark eingeschränktes Wachstum und eine sehr starke Verzweigung des Myzels. **B** Wachstum des Myzels auf 5 mM AS und 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MSX. Die Konidien sind ausgekeimt, aber das Wachstum ist deutlich gestört im Vergleich zu **A**, Oberseite der Agarplatte; **b** Unterseite der Agarplatte.

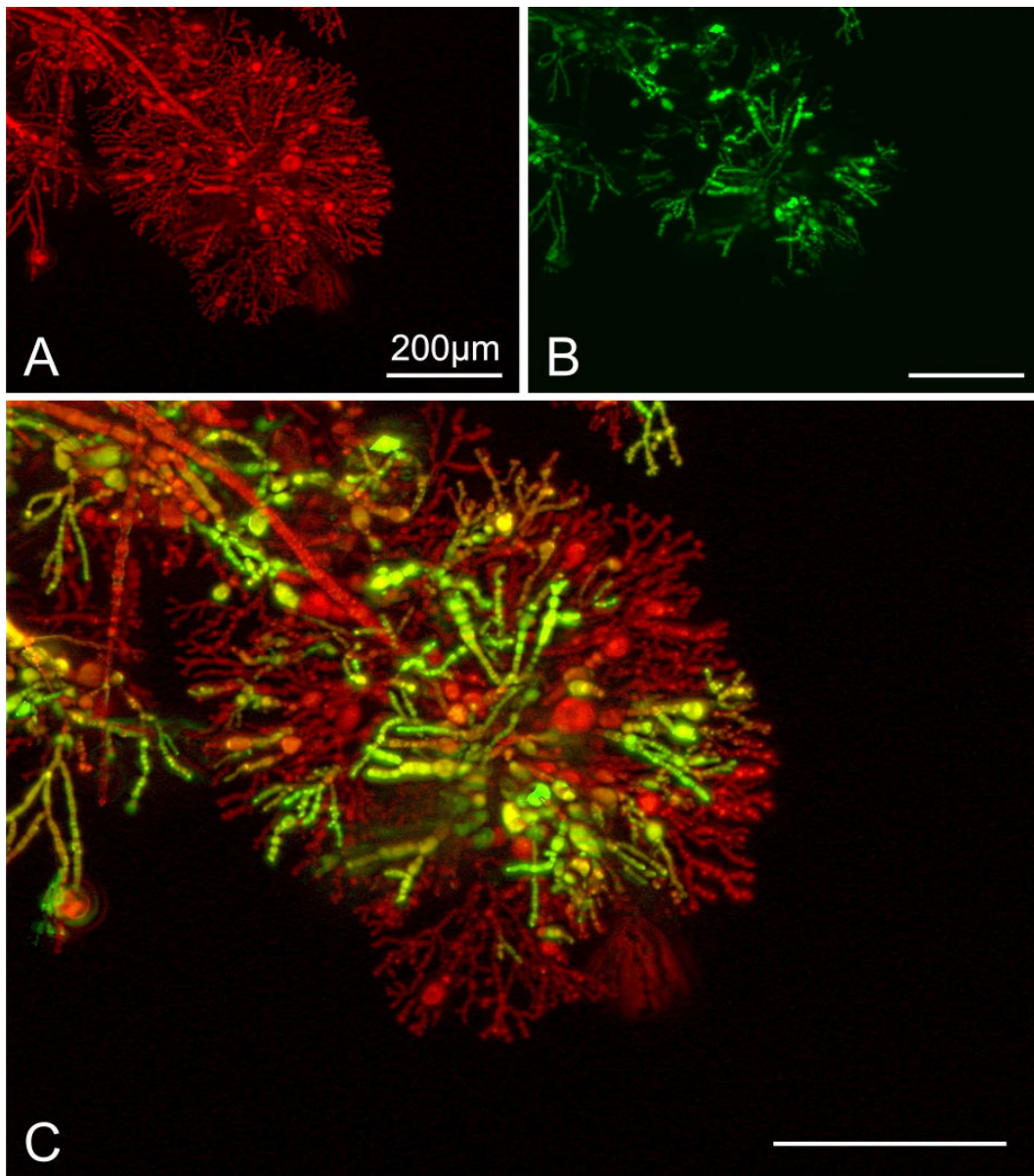


Abbildung A.8.: Detailaufnahme der Myzelmorphologie auf $MM_{mod.}$ -Agar, Saccharose mit 5mM AS, 4 dpi. **A** DsRed-Fluoreszenz, **B** GFP-Fluoreszenz und **C** Imageoverlay aus DsRed und GFP. Das Myzel zeigt eine sehr starke Verzweigung auf dem Medium sowie teilweise stark vergrößerte Myzelfäden. Fluoreszenzbilder zeigen eine Maximum-Intensitätsprojektion.

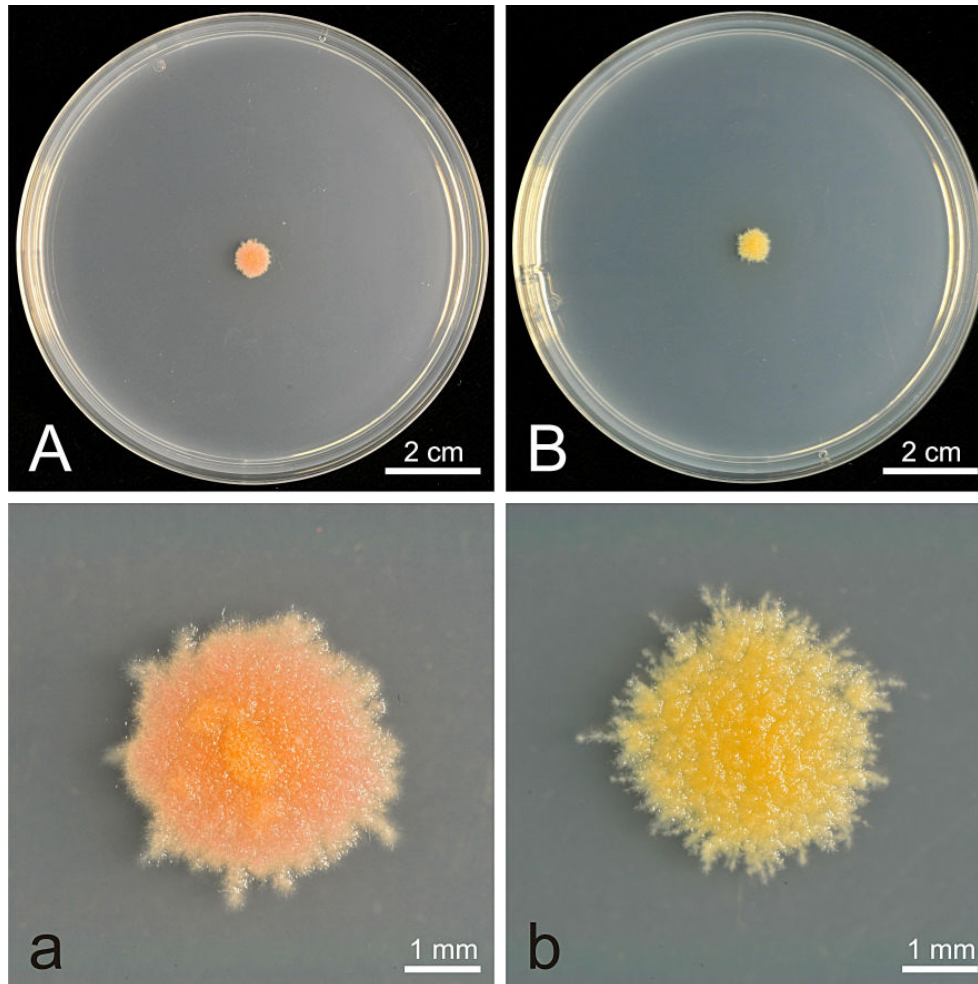


Abbildung A.9.: Myzelwachstum auf $MM_{mod.}$ mit 5 mM $CaNO_3$ bzw. $(NH_4)_2SO_4$ sowie 50 ng/mL Rapamycin, 5 dpi. **A** Wachstum des Myzels auf 5 mM $CaNO_3$ und 50 ng/mL Rapamycin; **a** Vergrößerte Kolonie aus **A**. **B** Wachstum des Myzels auf 5 mM AS und 50 ng/mL Rapamycin. **b** Vergrößerte Kolonie aus **B**. Das Längenwachstum des Myzels ist sehr stark eingeschränkt und die Hyphen zeigen eine sehr starke Verzweigung.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchzuführen und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Antonio Di Pietro für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Dr. Peter Köhler möchte ich mich für die Isolierung und Bereitstellung von HPLC-aufgereinigten Speicherproteinfraktionen ganz herzlich bedanken.

Für die Hilfestellung bei dem Versuch der Identifizierung der induktiven Komponenten aus dem Weizenrachisknoten am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung in Kaiserslautern möchte ich mich bei Herrn Dr. Eckhard Thines bedanken. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich ausdrücklich bei Frau Dr. Anja Schüffler und Anja Meffert, die mir bei der Isolierung und der anschließenden HPLC/MS-Auftrennung der Isolate eine unschätzbare Hilfe waren.

Ein ganz besonderer Dank gilt den beiden guten Seelen des Labors: Birgit Haderl und Cathrin Kröger. Sie haben nicht nur ihren Anteil an dieser Arbeit geleistet, sondern sind im Laufe der Jahre nicht nur gute Kolleginnen, sondern auch Freunde geworden. Ebenso möchte ich mich bei meinen Mitstreitern im Labor für eine sehr schöne Zeit bedanken! Nicht zuletzt möchte ich Herrn Dr. Frank Meier von ganzem Herzen danken! Er war maßgeblich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt und war, besonders im ersten etwas holperigen Jahr, ein steter und fester Bezugspunkt.

Herrn Dr. Dirk Becker möchte ich ganz besonders danken. Seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie sein unschätzbare Hinweis, dass meine Isolate aus Weizen- und Maiskörnern zu einem großen Teil aus Speicherproteinen bestehen, lieferte den entscheidenden Anhaltspunkt für die stickstoffabhängige *TRI5*-Regulation in meinem „Haustier“.

Ein sehr großer Dank gilt auch meinen guten Freunden Sandra, Anja, Michael, Sven, Christiane und besonders François. Sie waren im Laufe der Jahre nicht nur Mitbewohner, sondern vor allem Weggefährten und Leidensgenossen. Ich danke Euch für Eure Geduld und Eure Bereitschaft einfach da zu sein wenn man Euch braucht!

Mein letzter und größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mir Rückhalt gegeben und mich immer unterstützt haben!

DANKE an Euch Alle!