

Charakterisierung des Metaboloms
sowie des GABA-shunts
während der Weizenblüteninfektion von
Fusarium graminearum

Dissertation

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

vorgelegt von

Jakob Bönnighausen
aus Hamburg

Hamburg, Mai 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. W. SCHÄFER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. C. VOIGT
Tag der Disputation: 18. Juli 2014



Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

" We shall not cease from exploration, and the end of all our exploring will be to arrive
where we started and know the place for the first time."

T. S. Eliot (1888-1965)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Infektion und Lebenszyklus	1
1.2. Mykotoxine von <i>F. graminearum</i>	3
1.3. Bedeutung der DON-Synthese für die Weizeninfektion	4
1.4. Polyamin-Synthese im Zuge der <i>F. graminearum</i> -Infektion	5
1.5. 4-Aminobuttersäure (GABA) – ein ubiquitär vorkommender Stressmetabolit	6
1.6. Lokalisierung der Enzyme des GABA-shunts	7
1.7. Genetische Kontrolle des GABA-Metabolismus	8
1.8. GABA-Bildung infolge von abiotischen Stresszuständen sowie als Signalmetabolit	8
1.9. GABA in der Interaktion zwischen Wirt und Phytopathogenen	9
1.10. Untersuchung metabolischer Prozesse während der Pflanzeninfektion	11
1.11. Mitochondriale Energieerzeugung in Pilzen	12
1.12. Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. <i>F. graminearum</i> Stämme und generelle Kulturbedingungen	15
2.2. Eingesetzte Kulturmedien und Bedingungen	15
2.3. RNA Isolation und qRT-PCR Bedingungen	17
2.4. Erstellung der Vektoren	23
2.5. Hefe-Rekombinationsklonierung	24
2.6. Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.7. Southern-Blotting	26
2.8. Protoplasten-Transformation von <i>F. graminearum</i>	28
2.9. Untersuchung der Virulenz auf Weizen	29
2.10. DON-Quantifizierung <i>in vitro</i> sowie während der Pflanzeninfektion	29
2.11. pH-Wert Messungen in DON induzierenden Medien	30
2.12. Analyse des metabolischen Profils	31

2.13.	HPLC-Analysen (<i>in vitro</i> und von Weizengewebe).....	32
2.14.	Messungen der mitochondrialen Sauerstoffaufnahme	34
2.15.	Epifluoreszenz- und Laser-Scanning-Mikroskopie	35
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Vergleichbarkeit der $\Delta tr5$ - mit der Wildtyp-Infektion.....	37
3.2.	Hauptkomponentenanalyse sowie statistische Auswertung der gefundenen Metabolite.....	39
3.3.	Charakteristische Metabolite einer <i>Fusarium graminearum</i> -Infektion.....	41
3.4.	Stressperzeption und Signalmetabolite der Pflanzenverteidigung.....	41
3.5.	Die Infektion mit dem Wildtyp-Stamm führt zu einem Anstieg der Zuckeralkohole	43
3.6.	Die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies ist gestört während der Wildtyp-Infektion.....	43
3.7.	Metaboliten der Zellwand akkumulieren sowohl während der Wildtyp-Infektion als auch während der $\Delta tr5$ -Infektion.....	45
3.8.	Während der Wildtyp-Infektion kommt es zu einem Konzentrationsabfall der Aminosäuren	49
3.9.	Metabolisierung von Speicherstoffen und Kohlenhydraten im Zuge der Infektion.....	50
3.10.	Veränderungen in den Metaboliten des TCA-Zyklus sowie des GABA-shunts	52
3.11.	Generierung der Deletions-Mutanten sowie der GFP-Fusionskonstrukte	54
3.12.	Beide Transaminasen sind synergistisch am GABA-, Putrescin- und Spermidin-Abbau beteiligt	58
3.13.	Lokalisierung der Transaminasen	61
3.14.	Die $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten sind sensitiver gegen H_2O_2 Stress und bilden weniger Perithezien, sind jedoch unverändert in der Konidien-Keimungsrate.....	63
3.15.	Die Unterbrechung des GABA-Stoffwechsels in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten führt zu einer intrazellulären GABA-Akkumulation.....	65

3.16.	Die Gene des GABA-shunt sind in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten <i>in vitro</i> stärker induziert.....	67
3.17.	Der globale Stickstoffregulator AreA steuert die Expression der GABA-shunt-Gene.....	68
3.18.	GABA induziert die DON-Synthese <i>in vitro</i>	70
3.19.	Die <i>in vitro</i> GABA-Aufnahme führt zu einem Absinken des pH-Wertes....	72
3.20.	Die Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf Weizen ist stark verringert	74
3.21.	Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten bilden vergleichbare DON-Mengen wie der Wildtyp-Stamm	77
3.22.	Histologische Untersuchungen des frühen Infektionsverlaufs	79
3.23.	GABA wird während der Weizenblüten-Infektion gebildet.....	80
3.24.	Der GABA-Anstieg während der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten Infektion führt zu identischen Expressions-Änderungen wie bei der <i>in vitro</i> Induktion mit GABA	82
3.25.	Die Unterbrechung des GABA-Metabolismus führt zu einer verringerten Expression zweier TCA-Enzyme	84
3.26.	Die Energieproduktion der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist bei GABA-Zugabe stark verringert	85
3.27.	Die GABA-Zugabe führt zu einem Einbruch der mitochondrialen Atmung in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten	87
4.	Diskussion.....	90
4.1.	Charakteristische pilzliche Elicitoren	90
4.2.	Polyamin vermittelte Stressreaktionen während der Infektion	91
4.3.	Veränderungen in der Polyol-Konzentration und der Redox-Balance	92
4.4.	Die Redoxbalance ist gestört während der Infektion des Wildtyp-Stamms..	93
4.5.	Während der Wildtyp-Infektion finden apoptotische Prozesse statt.....	94
4.6.	Die Infektion des Wildtyps führt zu einem Absinken der Aminosäure-Konzentration	95
4.7.	Veränderungen im Fettsäureprofil sowie im Butanoat-Metabolismus während der Wildtyp-Infektion.....	97

4.8.	Die Infektion des $\Delta tr5$ -Stamms führt zu einem Anstieg von Signalmetaboliten	98
4.9.	Bei der Infektion mit dem Wildtyp und dem $\Delta tr5$ Stamm kommt es zu Veränderungen in Metaboliten der Zellwand	100
4.10.	Metabolisierung der Speichersubstanzen	101
4.11.	Zusammenfassung der metabolischen Veränderungen	103
4.12.	Die Infektion mit dem Wildtyp führt zu einem Anstieg des GABA-shunts	104
4.13.	Unterbrechung der Transaminierung im GABA-shunt	105
4.14.	Beide Transaminasen zeigen Substratspezifität und sind in den Polyamin-Katabolismus involviert	106
4.15.	Die Unterbrechung der GABA-Transaminierung führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber H_2O_2	107
4.16.	Der GABA-shunt ist wichtig für die Perithezien-Bildung nicht jedoch für die Keimung der Konidien	108
4.17.	<i>gta-1</i> befindet sich in den Mitochondrien, während sich <i>gta-2</i> im Cytosol befindet	109
4.18.	GABA induziert die DON-Bildung <i>in vitro</i>	110
4.19.	Die Aufnahme von GABA führt zu einem Absinken des pH-Wertes des Kulturmediums	112
4.20.	Die Expression der strukturellen GABA-Katabolismus-Gene wird wahrscheinlich über die intrazelluläre Konzentration gesteuert	113
4.21.	Der GABA-Metabolismus wird durch AreA reguliert	115
4.22.	GABA wird während der Weizenblüten-Infektion gebildet	116
4.23.	Die Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf Weizen ist reduziert	116
4.24.	Die mitochondriale Respiration ist gestört in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten	118
4.25.	Zusammenfassung	125
5.	Literatur	128

Abkürzungen

$\Delta\psi_m$	Ladungsgradient der mitochondrialen Membran
ΔpH	Protonengradient der mitochondrialen Membran
15-ADON	15-Acetyldeoxynivalenol
3-ADON	3-Acetyldeoxynivalenol
AAA	α -Aminoadipat
ACC-Oxidase	Aminocyclopropanecarboxylat-Oxidase
ACC-Synthase	Aminocyclopropanecarboxylat-Synthase
ACD	Arginin-Decarboxylase
Antimycin	Inhibitor von Komplex III
AOX	Alternative Oxidase
AreA	Transkriptionsfaktor des Stickstoffmetabolismus
AtGAT1	GABA-Transporter in <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AtProT2	Prolin-Transporter in <i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNS
CM	Complete medium, Vollmedium
creA	Transkriptionsfaktor der Katabolitrepression
CS	Citratsynthase
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DON	Deoxynivalenol
dpi	Days post inoculation, Tage nach Inokulation
DsRed	Rot fluoreszierendes Protein
Ear rot	Kolbenfäule
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
FCCP	Carbonyl Cyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FGL1	<i>Fusarium graminearum</i> Lipase 1
FHB	Fusarium head blight, Ährenbleiche
GABA	4-Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAP	GABA-Permease
GAT	GABA-Transaminase
GC	Gaschromatografie
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GHB	4-Hydroxybutansäure

Abkürzungen

gpdA	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase Promotor
hpi	Hours post inoculation, Stunden nach Inokulation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
Hyg	Hygromycin
intA	Integrator-Gen in <i>Aspergillus nidulans</i>
kb	Kilobasenpaare
Komplex I	NADH-Dehydrogenase
Komplex II	Succinat-Dehydrogenase
Komplex III	Cytochrom-c-Reduktase
Komplex IV	Cytochrom-c-Oxidase
Komplex V	ATP-Synthase
LC	Flüssigchromatografie
M	Molar (mol/L)
MM	Minimal medium
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
OCD	Ornithin-Decarboxylase
Nat	Nourseothricin
OCR	Oxygen consumption rate, Sauerstoffverbrauchsrate
Oligomycin	Inhibitor von Komplex V
OsGABA-T	GABA-Transaminase von <i>Oryzae sativa</i>
pacC	Transkriptionsfaktor von pH gesteuerten Genen
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCA	Principle component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pop2	GABA-Transaminase-Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>
ppm	Parts per Million
qpCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase-Kettenreaktion
rhod123	Rhodamin123, Fluoreszenzfarbstoff (Mitochondrien)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoff Spezies
Rotenon	Inhibitor von Komplex I
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

Abkürzungen

RR-Metabolit	Resistance-related Metabolit, Metabolit mit Bezug zur Pflanzenverteidigung
SD	Succinat-Dehydrogenase
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSADH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
TCA-Zyklus	Tri-Carbon-Säure Zyklus
Tri-Cluster	Trichothecen-Cluster
u. v. a. m.	Unter vielen anderen mehr
UGA1	GABA-Transaminase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UGA2	SSADH in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UGA3	Transkriptionsfaktor des GABA-Regulon in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UGA35/Dal81	Pleiotropher Transkriptionsfaktor des GABA-Regulon in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UGA4	GABA-Permease in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UGA43	Repressor des GABA-Regulons in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
v/v	Volumen pro Volumen
VDAC	Voltage-dependent-Anion-Channel (Spannungs abhängiger Anionen Kanal)
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp
ZEA	Zearalenon

Abbildungen:

Abbildung 1 Schadbild einer <i>F. graminearum</i> -Infektion auf Mais und Weizen	1
Abbildung 2 Lebenszyklus von <i>F. graminearum</i>	2
Abbildung 3 Der GABA-shunt	7
Abbildung 4 Erzeugung von ATP durch oxidative Phosphorylierung.....	13
Abbildung 5 Vektor-Klonierung und für die Lokalisation von <i>gta-1</i> und <i>gta-2</i>	26
Abbildung 6 Detektierte pilzliche β -Tubulin-Mengen im Rachisknoten.....	38
Abbildung 7 Isolation des Rachisknotens sowie Hauptkomponentenanalyse der detektierten Metabolite mittels GC/MS.	39
Abbildung 8 B. Hauptkomponentenanalyse mittels LC-GC/MS detektierten Metaboliten	40
Abbildung 9 Veränderungen im metabolischen Profil während der Wildtyp-Infektion.....	47
Abbildung 10 Veränderungen im metabolischen Profil während der $\Delta Tri5$ -Infektion	48
Abbildung 11 Vektor-Klonierung und Southern Strategie für die Deletion von <i>gta-1</i>	55
Abbildung 12 Vektor-Klonierung und Southern Strategie für die Deletion von <i>gta-2</i>	56
Abbildung 13 Vektor-Klonierung und Southern Strategie für die Deletion von <i>gta-2</i> im Δgta_1 Hintergrund	57
Abbildung 14 Nutzung verschiedener Stickstoffquellen im Minimalmedium (4 dpi)	59
Abbildung 15 Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (C-Quellen) in Minimalmedium (4 dpi).....	60
Abbildung 16 Wachstum auf Minimalmedien mit verschiedenen Polyaminen sowie Polyamin-Vorstufen (4 dpi)	61
Abbildung 17 Lokalisierung beider Transaminasen.....	62
Abbildung 18 Oxidativer-Stress in CM-Festmedium (4 dpi).....	63
Abbildung 19 Perithezien-Bildung auf Karottenagar	64
Abbildung 20 Bestimmung der GABA-Konzentrationen im Wildtyp und in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten.....	66
Abbildung 21 Expression der GABA-shunt-Gene <i>in vitro</i>	68
Abbildung 22 Expression der GABA-shunt-Gene in der $\Delta AreA$ -Mutante sowie Wachstum auf Festmedium.....	69
Abbildung 23 Deoxynivalenol Konzentration des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten <i>in vitro</i>	71
Abbildung 24 Entwicklung des pH-Wertes	73
Abbildung 25 Statistische Auswertung der Infektionsversuche auf Weizen (Kultivar <i>Nandu</i>) ...	75
Abbildung 26 Virulenz-Untersuchung auf Weizen (Kultivar <i>Nandu</i>).....	76
Abbildung 27 Deoxynivalenol-Konzentration des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten während der Weizenblüteninfektion.....	78
Abbildung 28 Untersuchung der frühen Infektion mit dem Wildtyp (Wt) sowie einer $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutante (10 dpi)	80
Abbildung 29 Bestimmung der GABA-Konzentrationen im Wildtyp und in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten.....	81
Abbildung 30 Expression der GABA-shunt-Gene <i>in planta</i>	83

Abbildung 31 Expression TCA-Enzyme unter <i>in-vitro</i> - und <i>in-planta</i> -Bedingungen	85
Abbildung 32 Analyse der mitochondrialen Energieproduktion mittels Rhodamin123.....	86
Abbildung 33 Untersuchung der Sauerstoffaufnahme (OCR) unter Kontrollbedingungen	87
Abbildung 34 Untersuchung der Sauerstoffaufnahme (OCR) bei Zugabe von GABA	89
Abbildung 35 GABA-Akkumulation im mitochondrialen Intermembranraum (Wt-Situation) ...	123
Abbildung 36 Akkumulation im mitochondrialen Intermembranraum (Mutanten-Situation)....	124
Abbildung 37 Zusammenfassung des GABA-Metabolismus zwischen <i>Triticum aestivum</i> und <i>Fusarium graminearum</i> während der Infektion	126

Tabellen:

Tabelle 1 Eingesetzte Primer	18
Tabelle 2 HPLC-Gradientenprofil zur Detektion von GABA im Pflanzengewebe	33
Tabelle 3 Keimungsrate der Konidien auf CM-Festmedium.....	64
Tabelle 4 Expression der Tri-Gene in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (5 dpi)	79
Tabelle 5 Regulation der Gene der Ethylen-Synthese (<i>T. aestivum</i>) sowie der <i>F. graminearum</i> Katalasen (5 dpi)	84

1. Einleitung

1.1. Infektion und Lebenszyklus

Fusarium graminearum (Teleomorph *Gibberella zea*) ist ein filamentöser Ascomyzet und der Haupterreger der Ährenbleiche (Fusarium head blight, FHB) bei Weizen (*Triticum aestivum*) beziehungsweise der Kolbenfäule (ear rot) beim Mais (*Zea mays*) (Abbildung 1). Neben Weizen und Mais werden auch Gerste (*Hordeum vulgare*) sowie kleinkörnige Gräser von geringerer ökonomischer Bedeutung befallen. *F. graminearum* wird häufig als hemibiotropher Schaderreger klassifiziert (Brown *et al.* 2010). Detaillierte mikroskopische Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass bereits bei der initialen Infektion Nekrosen auftreten, die nicht mit einer frühen biotrophen Phase in Einklang zu bringen sind (Boenisch und Schäfer 2011).



Abbildung 1 Schadbild einer *F. graminearum*-Infektion auf Mais und Weizen. Die Infektion führt auf Mais zur Kolbenfäule (ear rot). Beim Befall von Weizen kommt es zum Ausbleichen der Ähre (Fusarium Head Blight, FHB). Bei der Infektion beider Wirtspflanzen kommt es zur Kontamination der Körner mit Mykotoxinen aus der Klasse der Trichothecene. (Maisinfektionen 42 dpi, Weizeninfektionen 21 dpi).

Fusarium graminearum überwintert als saprophytisches Myzel in infizierten Ernterückständen, auf denen Fruchtkörper (Perithezien) gebildet werden (Gilbert und Fernando 2004). Die Bildung der Perithezien kann dabei durch Selbstung eines Stammes stattfinden (homothallisch). Aus den Perithezien werden die sexuellen Ascosporen freigesetzt, die durch Wind, Regen oder Insekten verbreitet werden (Goswami und Kistler 2004). Landen die Sporen auf Weizenpflanzen während der Blüte, beginnt die Bildung komplexer Infektionsstrukturen (Boenisch und Schäfer 2011). Nach der initialen Penetration wachsen die Hyphen durch das Leitgewebe und infizieren die restlichen Blüten der Ähre. Auf den infizierten Ähren werden asexuelle Konidiosporen gebildet, die weitere Pflanzen infizieren können. (Abbildung 2). Epidemiologisch stellen die Ascosporen bei einer *F. graminearum*-Infektion im Feld das Primärinokulum dar (Gilbert und Fernando 2004). Die Verbreitung durch Konidiosporen ist von untergeordneter Bedeutung für die *F. graminearum*-Infektion (Paulitz 1999).

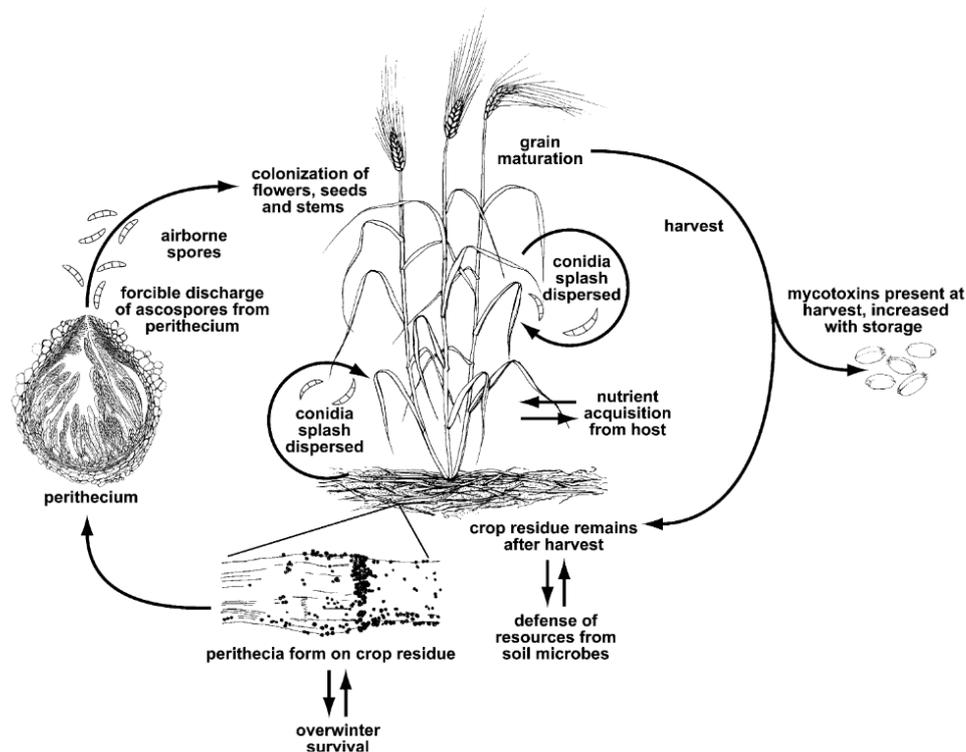


Abbildung 2 Lebenszyklus von *F. graminearum*. Das Primärinokulum stellen die sexuell gebildeten Ascosporen dar, welche auf Ernterückständen im Feld gebildet werden. Bei feuchtwarmen Bedingungen werden die Ascosporen aus den Fruchtkörpern (Perithezien) freigesetzt. Die freigesetzten Sporen infizieren Weizenpflanzen während der Blüte. Auf befallenen Pflanzen werden Konidien (asexuelle Sporen) gebildet, die zu einer Sekundärinfektion führen. *Fusarium graminearum* überwintert im Boden in Form von Ernterückständen, auf denen erneut Perithezien gebildet werden. Im Frühjahr breitet sich die Infektion ausgehend von den Ernterückständen wieder aus. Abbildung entnommen aus Trail (2009).

Fusarium head blight tritt in den gemäßigten Klimazonen der Erde auf, wobei am häufigsten Infektionen aus den Vereinigten Staaten von Amerika, Kanada, China und Europa gemeldet werden (McMullen *et al.* 1997).

Schätzungen ergaben, dass *F. graminearum* alleine in China bis 7 Millionen Hektar Ackerfläche befällt, was zu einem Verlust von bis zu 2,5 Millionen Tonnen Getreide führt (Duveiller *et al.* 2007). Das epidemiologische Risiko wird durch das feuchtwarme Wetter sowie ausgedehnte Regenfälle im Frühjahr oder Sommer signifikant erhöht (Sutton 1982, Stack 1999).

1.2. Mykotoxine von *F. graminearum*

Die Infektion mit *F. graminearum* auf Weizen führt häufig zu Ertragsverlusten sowie der Bildung von eingetrockneten und verfärbten Körnern (McMullen *et al.* 1997). Das betroffene Getreide ist häufig kontaminiert mit hitzestabilen Mykotoxinen aus der Übergruppe der Trichothecene. Unterteilt werden die Trichothecene in Typ A (T-2 Toxin und Diacetoxyscirpenol) sowie in Typ B (Fusarenon-x, Nivalenol sowie Deoxynivalenol) (Bennet und Klich 2003). Während der Weizenblüteninfektion kommt es durch *F. graminearum* früh zur Bildung von Deoxynivalenol (DON) sowie von verschiedenen acetylierten Derivaten. Unterschieden wird dabei zwischen 3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON), 15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON). Die Bildung des jeweiligen Derivats wird für die Einteilung in *F. graminearum*-Chemotypen genutzt (Kazan *et al.* 2012). DON wird als Produkt der Sesquiterpen-Biosynthese mit Farnesylpyrophosphat als Startermolekül gebildet. Die Toxizität von DON besteht in der Inhibierung von Peptidyltransferasen. Diese Hemmung unterbindet die Ausbildung der Peptidbindung an den Ribosomen. Wird mit DON kontaminiertes Getreide aufgenommen, kommt es zu Übelkeit, Erbrechen und genereller Immunsuppression (Bennet und Klich 2003).

Ein zweites *F. graminearum*-Mykotoxin ist das Polyketid Zearalenon (ZEA). Die Synthese von Zearalenon geht von Acetyl-CoA sowie Malonyl-CoA aus. Zearalenon wird aufgrund seiner Wechselwirkung mit den humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β (Zinedine *et al.* 2007) als nicht steroidales Mykoöstrogen beschrieben. Zearalenon wird nicht während der Weizeninfektion gebildet, sondern akkumuliert beim „post harvest“ Befall von Weizenkörnern (Voigt *et al.* 2007). Für die Infektion der Wirtspflanzen ist die Bildung von Zearalenon daher nicht essenziell.

1.3. Bedeutung der DON-Synthese für die Weizeninfektion

Initial wird die Weizenblüte durch die Bildung von verschiedenen Typen von komplexen Infektionsstrukturen (Appressorien) infiziert (Boenisch und Schäfer 2011). Obwohl in den Infektionsstrukturen die Trichothecensynthese bereits frühzeitig anläuft, bilden $\Delta tr5$ -Mutanten ebenfalls Infektionsstrukturen und penetrieren erfolgreich das Wirtsgewebe (Boenisch und Schäfer 2011). Für die initiale Infektion ist die Bildung von DON daher nicht erforderlich. Im weiteren Verlauf der Infektion wachsen die Pilzhyphen durch den Übergang des Blütenbodens zum Leitgewebe der Ähre. Dieses Gewebe, auch als Rachisknoten bezeichnet, ist eine hochgradig induktiv wirkende Zone für die DON-Biosynthese (Ilgen *et al.* 2009). Die Gene für die Synthese von sekundären Stoffwechselmetaboliten sind in filamentösen Ascomyzeten häufig in Genclustern organisiert. Beispiele dafür finden sich in der Sterigmatocystin- und Aflatoxin-Biosynthese in *Aspergillus nidulans*, der Penicilin-Biosynthese in *Penicillium chrysogenum* sowie der Trichothecen- und Zearalenon-Biosynthese in *Fusarium* Spezies (Keller und Hohn 1997). In *F. graminearum* steht der sogenannte „Tri-Cluster“ unter Kontrolle zweier im Cluster lokalisierter Transkriptionsfaktoren (Tri6 sowie Tri10). Durch die Zyklisierung von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien durch die Trichodien Synthase (*Tr5*), dem ersten Enzym des Clusters, wird die DON-Synthese eingeleitet. Die Deletion von *Tr5* führt mangels alternativer Synthesewege zu einem kompletten Einbruch der Toxinsynthese (Proctor *et al.* 1995). DON ist ein essenzieller Virulenzfaktor für die Kolonisierung der Weizenähren, nicht jedoch für die Infektion von Gerste und Mais (Maier *et al.* 2006).

Fusarium graminearum-Mutanten, die in der DON-Synthese gestört sind, kolonisieren nur die infizierte Blüte und wachsen nicht mehr durch den Rachisknoten (Proctor *et al.* 1995, Maier *et al.* 2006). Dem Rachisknoten kommt damit eine tragende Rolle für die pilzliche Virulenz beziehungsweise für den Aufbau der Pflanzenverteidigung zu. Strukturell scheinen die Zellwände des Rachisknoten während der Infektion mit $\Delta tr5$ -Stämmen massiv verstärkt zu werden, wobei der zugrunde liegende Mechanismus aktuell noch unbekannt ist (Jansen *et al.* 2005). Bei der Infektion mit Deletionsmutanten der sekretierten Lipase FGL1 bleibt die Infektion ebenfalls auf die inokulierte Blüte beschränkt (Voigt *et al.* 2005).

Derzeit stehen keine kommerziellen Weizensorten mit starker FHB-Resistenz zur Verfügung. Daher wird in der Pflanzenzüchtung versucht, verschiedene Typen von

Resistenzen in die Produktionslinien einzukreuzen. Die FHB-Resistenz wird abhängig vom Verlauf der Infektion in Typ I (Resistenz gegen die Initiale Infektion) und Typ II (Wachstum innerhalb der Ähre) unterteilt (Schröder und Christensen 1963). Weitere Resistenzformen sind u. a. Typ III (Infektion der Körner) sowie Typ IV (Resistenz durch Detoxifizierung) (Mesterhazy 1995).

1.4. Polyamin-Synthese im Zuge der *F. graminearum*-Infektion

Aufgrund der volkswirtschaftlichen Bedeutung der Fusarientoxine ist die DON-Biosynthese auf molekularer Ebene gut aufgeklärt. Die beteiligten Enzyme sowie die einzelnen Synthesereaktionen sind im Detail beschrieben (Kimura *et al.* 2007). Unklar sind bisher die Faktoren und Bedingungen, die zur Induktion während der Pflanzeninfektion führen. Bisher wurden in Kultur Polyaminen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), bestimmten Zuckerquellen sowie ein saurer pH-Wert eine induktive Wirkung auf die DON-Synthese zugeschrieben (Gardiner *et al.* 2009, Ponts *et al.* 2009, Jiao *et al.* 2008, Gardiner *et al.* 2009, Merhej *et al.* 2010). Unter den bereits beschriebenen Induktoren sind die Polyamine aufgrund ihrer Verbindung zur Stressantwort der Pflanze von besonderem Interesse. Grundsätzlich werden Polyamine bei verschiedenen physiologischen Stressbedingungen durch Aktivität der Schlüsselenzyme Ornithin-Decarboxylase (OCD) sowie Arginin-Decarboxylase (ACD) gebildet. Häufig beschrieben wird die Bildung des Polyamins Putrescin bei osmotischem Stress, Verletzungen und Induktion durch Jasmonsäure oder Abscisinsäure (Alcázar *et al.* 2010).

Bei der Infektion von *T. aestivum* durch *F. graminearum* werden vermehrt Polyamine synthetisiert. Die Synthese erfolgt seitens der Pflanze durch vermehrte Expression der OCD sowie der ACD. Im infizierten Weizengewebe steigt im Anschluss die Konzentration von Putrescin, Spermidin und Cadaverin an (Gardiner *et al.* 2010). Der Anstieg von Putrescin findet dabei bereits einen Tag nach der Infektion statt, was den Schluss nahelegt, dass die Induktion des Tri-Clusters durch Polyamine vermittelt wird (Gardiner *et al.* 2010).

In der Pflanzenverteidigung wird die Bildung von Polyaminen als Konjugat mit Hydroxymitsäuren beschrieben. Obwohl die Rolle der Polyaminkonjugate noch nicht abschließend geklärt ist, sind z. B. Dimere von 4-Coumarylagmatin (Hordatol) als Inhibitoren des pilzlichen Wachstums charakterisiert (Bagni und Tassoni 2001). Polyamine

werden abgebaut durch Diaminoxidasen oder Polyaminoxidasen, wobei 4-Aminobutanal entsteht. Bei dieser Reaktion wird H_2O_2 freigesetzt, weshalb diese Reaktion auch als Abwehr gegen Infektionen dienen könnte (Walters 2003). Durch eine Aldehyddehydrogenase wird 4-Aminobutanal umgesetzt zu 4-Aminobuttersäure (GABA). Der Polyaminstoffwechsel sowie der GABA-Metabolismus sind daher miteinander verbundene Reaktionen.

1.5.4-Aminobuttersäure (GABA) – ein ubiquitär vorkommender Stressmetabolit

4-Aminobuttersäure ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die ubiquitär in Pilzen, Algen, Farnen, höheren Pflanzen und Tieren vorkommt. Die Isolierung erfolgte erstmals 1949 aus Gewebe von *Solanum tuberosum* (Steward *et al.* 1949). Das Hauptaugenmerk der Forschung richtete sich in den nachfolgenden Jahren auf die Bedeutung von GABA in der Signaltransduktion im humanen Cortex. GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, wohingegen der Vorläufer Glutamat zu den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmittern gezählt wird (Petroff 2002).

Der GABA-Metabolismus besteht aus drei enzymatisch katalysierten Reaktionen, die als GABA-shunt bezeichnet werden (Abbildung 3). Der Kreislauf beginnt mit der Decarboxylierung von Glutamat zu GABA durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD) im Cytosol. Der Großteil der endogenen Produktion von GABA erfolgt über die GAD-vermittelte Metabolisierung von Glutamat. Das Aktivitätsoptimum der GAD liegt bei pH 6,0 und wird über den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex gesteuert (Snedden *et al.* 1992, Baum *et al.* 1996). GABA wird von Transaminasen (GAT) zu Succinat-Semialdehyd (SSA) umgesetzt. Die GAD als auch die GAT-Reaktion finden nur nach Bindung des Cofaktors Pyridoxalphosphat statt. SSA wird von Succinat-Semialdehyd Dehydrogenasen (SSADH) zu Succinat umgesetzt.

Aus SSA kann in einer Nebenreaktion durch eine Glyoxylatreduktase auch 4-Hydroxybutansäure (GHB) gebildet werden (Breitkreuz *et al.* 2003). GHB ist, wie GABA, höchstwahrscheinlich in der Stressantwort involviert (Allan *et al.* 2008). Die Bildung von GHB kann sowohl im Cytosol als auch in den Plastiden stattfinden (Shelp *et al.* 2012). Die Reaktionsschritte, ausgehend von der Decarboxylierung bis hin zur Einspeisung in den Tri-Carbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) werden als GABA-

shunt bezeichnet (Abbildung 3). Sowohl die GAT als auch die SSADH sind häufig in den Mitochondrien lokalisiert.

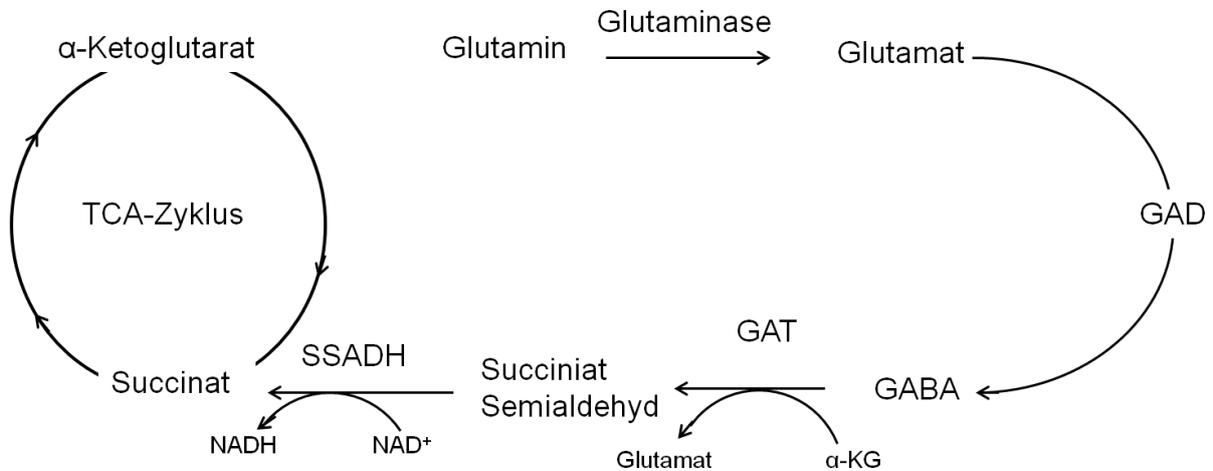


Abbildung 3 Der GABA-shunt. Durch die Decarboxylierung von Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD) wird GABA gebildet. GABA-Transaminasen (GAT) übertragen die Aminogruppe auf α -Ketoglutarat und rekonstruieren dabei Glutamat. Als Produkt der Transaminierung entsteht Succinat-Semialdehyd. Dieses wird durch Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenasen (SSADH) zu Succinat umgesetzt. Succinat geht als Substrat in den TCA-Zyklus ein.

Im letzten Reaktionsschritt des GABA-shunts werden NADH sowie Succinat generiert, welche als Substrate für die Komplexe der Atmungskette und dem TCA-Zyklus dienen. Biochemisch erfolgt die GABA-Metabolisierung durch den GABA-shunt und mündet in den TCA-Zyklus. Die Bildung von Succinat über SSA erfolgt in Abhängigkeit des Energielevels und wird negativ über die ATP- sowie NADH-Konzentrationen reguliert (Bouché und Fromm 2004). Dieser Rückkopplungsmechanismus stellt sicher, dass die SSADH-Reaktion und damit die Bildung von Succinat aus GABA nur unter Energiemangel-Bedingungen stattfindet.

1.6. Lokalisierung der Enzyme des GABA-shunts

In *Arabidopsis thaliana* findet die Aufnahme von GABA durch einen Prolin-Transporter (AtProT2) sowie einen GABA-Transporter (AtGAT1) statt (Shelp *et al.* 2012, Meyer *et al.* 2006). Die Decarboxylierungsreaktion (GAD-Reaktion) findet im Cytosol statt, wobei sowohl die GAT-Reaktion als auch die SSADH-Reaktion häufig in den Mitochondrien stattfindet (Shelp *et al.* 2012). Diese Lokalisierung der beteiligten Enzyme ist nicht in jedem Organismus konserviert. In *S. lycopersicum* zum Bei-

spiel existieren mehrere GABA-Transaminasen-Isoformen, die entweder in die Plastiden, das Cytosol oder in die Mitochondrien importiert werden (Clark *et al.* 2009). In *Saccharomyces cerevisiae* fehlt eine N-terminale Signalsequenz für den Mitochondrienimport einer SSADH. Später konnte auf subzellulärer Ebene gezeigt werden, dass eine SSADH-GFP-Fusion im Cytosol akkumuliert (Coleman *et al.* 2001, Huh *et al.* 2003). Die Metabolite der cytosolischen sowie der mitochondrialen Reaktionsschritte werden durch Permeasen in die entsprechenden Kompartimente gebracht. Diese GABA-Permeasen sind daher das Bindeglied zwischen der GABA-Bildung im Cytosol sowie der Metabolisierung in den Mitochondrien (Michaeli *et al.* 2011).

1.7. Genetische Kontrolle des GABA-Metabolismus

Die genetische Kontrolle des GABA-Katabolismus ist vor allem durch Studien in *S. cerevisiae* sowie in *A. nidulans* aufgeklärt worden. In *S. cerevisiae* wird der GABA-Stoffwechsel durch zwei positiv wirkende Transkriptionsfaktoren UGA3 sowie UGA35 (Dal81) gesteuert. Die Induktion des GABA-Abbaus erfolgt über UGA3 sowie UGA35, wobei die Expression der GABA-Permease (UGA4), der GABA-Transaminase (UGA1) sowie der Succinat-Semialdehyde Dehydrogenase (UGA3) hochreguliert wird (Vissers *et al.* 1990). Die Regulierung der strukturellen GABA-Gene erfolgt damit in Form eines Regulons durch Substrataufnahme. Der Import von GABA kann durch die UGA4-Permease, eine generelle Aminosäuren-Permease sowie eine Prolin-Permease stattfinden (Kumar und Punekar 1997).

In *A. nidulans* unterliegt die Regulation der GABA-Permease dem pH-Wert vermittelt über *pacC*, dem Integrator Gen *intA*, dem Kataboliterepressor *creA* sowie dem globalen Stickstoffregulator *AreA* (Hutchings *et al.* 1999, Kumar und Punekar 1997).

1.8. GABA-Bildung infolge von abiotischen Stresszuständen sowie als Signalmetabolit

Die Bildung von GABA findet häufig bei einer Reihe von physiologischen Stresszuständen, wie zum Beispiel Kälte, Hitze, mechanischer Verwundung, UV-Stress u. a. statt (Bown und Shelp 1997, Kinnersly und Turano 2000). In kälteresistenten *Hordeum*- und *Triticum*-Linien ist die GABA-Konzentration im Gegensatz zu den frost-

sensitiven Linien stark erhöht (Mazzucotelli *et al.* 2006). Diskutiert wird ebenfalls eine Rolle als osmotisch wirkende Substanz nach Salzstress. In Tabak-Zellkulturen steigt die GABA-Konzentration bei ansteigenden Natriumchlorid-Konzentrationen an, was den Schluss nahelegt, dass GABA im Zuge des Salzstress aktiv gebildet wird und eine Rolle in der Stoffwechselantwort spielt (Binzel *et al.* 1987). Die Generierung von transgenen Linien, die im GABA-Stoffwechsel gestört sind, hat die Erforschung und die Validierung einiger bisher aufgestellter Hypothesen möglich gemacht. Neuere Untersuchungen in *A. thaliana* konnten zeigen, dass in dieser Pflanze der GABA-Stoffwechsel auf ionischen, nicht jedoch auf osmotischen Stress reagiert (Renault *et al.* 2010).

Während in früheren Untersuchungen die Rolle von GABA im Zuge verschiedener abiotischer Stressfaktoren beschrieben wurde, wendet sich die aktuelle Forschung der Rolle von GABA als Signalmetaboliten zu. Untersuchungen in *A. thaliana* konnten zeigen, dass die Akkumulation von GABA zu weitreichenden Expressionsänderungen führt (Roberts 2007). GABA als Botenstoff ist auch in die Steuerung von Entwicklungsprozessen während der Befruchtung involviert. Wird in *A. thaliana* die GABA-Transaminierung unterbrochen (pop2 Mutation), kommt es zu einem fehlgerichteten Wachstum des Pollenschlauches. Der Abbau eines maternalen GABA-Gradienten durch GABA-Transaminasen des Pollens ermöglicht ein zielgerichtetes Wachstum des Pollenschlauchs. Dieser chemotaxische Prozess ist in pop2-Mutanten gestört und führt dazu, dass der Pollenschlauch an den Samenanlagen vorbei wächst (Palanivelu *et al.* 2003). Unbekannt ist bisher, wie die Signalwirkung von GABA vermittelt wird, obwohl erste Untersuchungen eine Bindung an Glutamatrezeptoren nahelegen (Kinnersley und Turano 2000).

1.9. GABA in der Interaktion zwischen Wirt und Phytopathogenen

Während die beteiligten Gene des GABA-Katabolismus sowie ihre spezifische Regulation gut aufgeklärt sind, ist die Rolle von GABA in der Pflanzenverteidigung bisher nur wenig erforscht. Häufig diskutierte Faktoren für die Induktion der GABA-Bildung ist die Aktivierung der GAD durch den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex sowie ein niedriger physiologischer pH-Wert des Cytosols (Snedden *et al.* 1995, Crawford *et al.* 1994). Calcium-Ionen sind als „Second Messenger“ im Zuge der Pflanzenverteidigung beschrieben worden (Lecourieux *et al.* 2006). Im Zuge des Einstroms von Ca^{2+} könnte

es zu einer Aktivierung der GAD kommen, was zu einer GABA-Akkumulation führt. Eine erhöhte GABA-Bildung ist bei Infektion von *Oryza sativa*, *H. vulgare* und *Brachypodium distachyon* durch *Magnaporthe grisea* beschrieben worden (Parker *et al.* 2009). Die GABA-Bildung erfolgt daher unabhängig von den jeweiligen Wirtspflanzen und scheint auf konservierten Verteidigungsreaktionen zu beruhen. Die GABA-Bildung ist in *O. sativa* durch einen Elicitor der Zellwand von *M. oryzae* induzierbar und geht einher mit Veränderungen in der Konzentration von Metaboliten des TCA-Zyklus (Takahashi *et al.* 2008). Von Pflanzenseite erfolgt, u. a. durch Salicylsäure vermittelt, eine Induktion der OsGABA-T (GABA-Transaminase) bei Befall mit einem virulenten *M. oryzae* Isolat (Wu *et al.* 2006). Dies spricht dafür, dass GABA während der Infektion von Pflanzenseite metabolisiert wird. *M. oryzae* Deletionsmutanten der GABA-Transaminase sowie der SSADH sind stark verringert in ihrer Virulenz auf Reis und Gerste, was die Bedeutung des pilzlichen GABA-Metabolismus für eine erfolgreiche Infektion unterstreicht (Guo *et al.* 2011).

Bei der Infektion von *A. thaliana* mit *Pseudomonas syringae* konnte gezeigt werden, dass der Abbau des pflanzlichen GABA einen großen Einfluss auf die bakterielle Virulenz hat. Die Deletion aller drei bakteriellen GABA-Transaminasen führt dabei zu einer verringerten Virulenz während der *A. thaliana*-Infektion. Werden pop2-Mutanten von *A. thaliana* mit dem Triple-Deletionsstamm infiziert, ist die Virulenz weitaus stärker reduziert (Park *et al.* 2010). Dieses Experiment legt den Schluss nahe, dass 1. der GABA-Metabolismus des Pathogens essenziell für eine erfolgreiche Infektion ist und 2. hohe pflanzliche GABA-Konzentrationen, die vom Pathogen nicht abgebaut werden, sich negativ auf den Erfolg der Infektion auswirken (Park *et al.* 2010). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von GABA für eine erfolgreiche Infektion ist die Infektion von *S. lycopersicum* mit dem biotrophen Pilz *Cladosporium fulvum*. Während des Wachstums im apoplastischen Raum kommt es zu einem Anstieg der GABA-Konzentration. Die Autoren schlussfolgern, dass GABA eine wichtige Stickstoffquelle für das Pathogen während der Infektion darstellt (Solomon und Oliver 2002).

Für *F. graminearum* sind bisher keine Untersuchungen des GABA-Metabolismus und seiner Bedeutung für die Virulenz durchgeführt worden. Suzuki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Verstoffwechslung der Polyamine von einem GABA-Anstieg begleitet wird (Suzuki *et al.* 2013). Die GABA-Konzentration ist im DON induzierenden, Polyamin freien DON-Induktionsmedium mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ als Stickstoffquelle ebenfalls stark erhöht, was auf eine direkte Verbindung zwischen GABA und DON-

Synthese hindeutet (Lowe *et al.* 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beim Abbau der pflanzlichen Zellwand alle Gene des *F. graminearum* GABA-shunt induziert werden (Carapito *et al.* 2008). Der Metabolismus von GABA könnte damit nicht nur die Verbindung zwischen Polyaminstoffwechsel und DON-Synthese *in planta*, sondern darüber hinaus einen essenziellen Stoffwechselweg während der Pflanzeninfektion darstellen. Es ist daher notwendig, neben der *in vitro*-Analyse auch die metabolischen Prozesse während der Pflanzeninfektion zu verstehen.

1.10. Untersuchung metabolischer Prozesse während der Pflanzeninfektion

Die Analyse des metabolischen Profils während der Pflanzeninfektion ermöglicht es, eine Vielzahl von Stoffwechselwegen zu identifizieren, die im Zuge der Infektion aktiviert werden. Ein Vorteil von Metabolom- gegenüber Transkriptom- oder Proteom-Ansätzen ist dabei die hohe Korrelation zwischen dem untersuchten Phänotyp und dem metabolischen Muster (Allwood *et al.* 2008). Das Metabolom wird dabei nicht beeinflusst von Expressionsänderungen (Transkriptom) sowie von post-translationalen Änderungen (Proteom). Die Untersuchung des Metaboloms ermöglicht daher einen direkten Nachweis ohne etwaige auftretende transkriptionelle Amplifizierungskaskaden oder spätere Veränderungen in der Proteinaktivität (Phosphorylierungen, Glykosylierungen u. a.) (Tan *et al.* 2009). Ein Grundproblem von metabolomischen Ansätzen der Phytopathologie besteht in der Vermischung von Metaboliten beider Interaktionspartner. Durch die Infektion der Pflanze mit einem Pathogen liegt ein durch reziproke Prozesse erzeugtes Metabolom vor. Der Anteil von spezifischen Metaboliten (z. B. Ergosterol als charakteristisches pilzliches Membranlipid) eines Interaktionspartners ist dabei weitaus geringer als der Anteil von generischen Metaboliten. Chemisch lassen sich zum Beispiel Zuckerverbindungen (Glukose, Fructose u. v. a. m.) nicht einem Interaktionspartner zuordnen. Die bloße Untersuchung eines metabolischen Profils erlaubt es daher häufig nicht, die Bedeutung eines Stoffwechselweges für einem Interaktionspartner zu charakterisieren. Wird hingegen der Metabolismus in einem Interaktionspartner ausgeschaltet, kann die Bedeutung dieses Metaboliten für den Erfolg der Infektion nachvollzogen werden.

Bisherige metabolomische Untersuchungen zielten auf die Entdeckung globaler metabolischer Veränderungen bei der Infektion von mehreren Wirtsarten oder die

Entdeckung von putativen Resistenzmetaboliten ab. Werden zum Beispiel *O. sativa*, *H. vulgare* sowie *B. distachyon* mit *M. oryzae* infiziert, kommt es zu einer metabolischen Umprogrammierung des Stoffwechsels aller Wirtspflanzen, die in der Akkumulation von Phenylpropanoiden sowie Veränderungen des Energiestoffwechsels münden (Parker *et al.* 2009). Das metabolische Profil einer *F. graminearum*-Infektion wurde bisher im Hinblick auf mögliche Resistenzmetaboliten untersucht. Zu diesem Zweck wurden Weizenlinien mit verschiedenen Ausprägungen von FHB Typ II-Resistenzen verglichen. Resistenzen gegenüber FHB korrelieren dabei häufig mit einem Anstieg von Zimtsäuren sowie Veränderungen im Zucker und Fettsäureprofil (Hamzehzarghani *et al.* 2005). Die benötigten Metabolite für die Synthese der Sekundärmetabolite werden dabei aus dem Primärstoffwechsel entnommen. Einer der wichtigsten Stoffwechselwege ist dabei der TCA-Zyklus, der die Reduktionsäquivalente für die Generierung von ATP liefert.

1.11. Mitochondriale Energieerzeugung in Pilzen

Die oxidative Phosphorylierung zur ATP-Generierung erfolgt in den fünf Komplexen der Atmungskette in den Mitochondrien. Die Komplexe I, III und IV pumpen Protonen aus der Matrix des Mitochondriums in den Intermembranraum. Der erzeugte Potentialgradient generiert beim Rückstrom durch die ATP-Synthase (Komplex V) ATP (Abbildung 4). In phytopathogenen Erregern sind die Komplexe der Atmungskette ein beliebtes Ziel von Fungiziden (Barlett *et al.* 2002). Die Erforschung der pilzlichen Respiration ist daher eng gekoppelt an die Entwicklung neuer Fungizide. Häufig eingesetzte Fungizide stammen aus der Strobilurin-Klasse (Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Fluoxastrobin u. v. m.) und unterbrechen den Elektronentransport im Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase). Resistenzen treten häufig in Stämmen auf, die einen Bypass der Atmungskette in Form der Alternativen Oxidase (AOX) aufweisen. Dieses Enzym ermöglicht es, die Komplexe III und IV zu überbrücken und Elektronen durch Ubiquinon direkt auf die AOX zu übertragen. Die AOX übernimmt dabei die Rolle des Komplex IV und reduziert Sauerstoff zu Wasser. Die Energieausbeute ist dabei geringer, da keine Protonen von den Komplexen III und IV gepumpt werden. Dies hat zur Folge, dass das mitochondriale Membranpotential und damit die Möglichkeit im Komplex V ATP zu erzeugen, eingeschränkt ist.

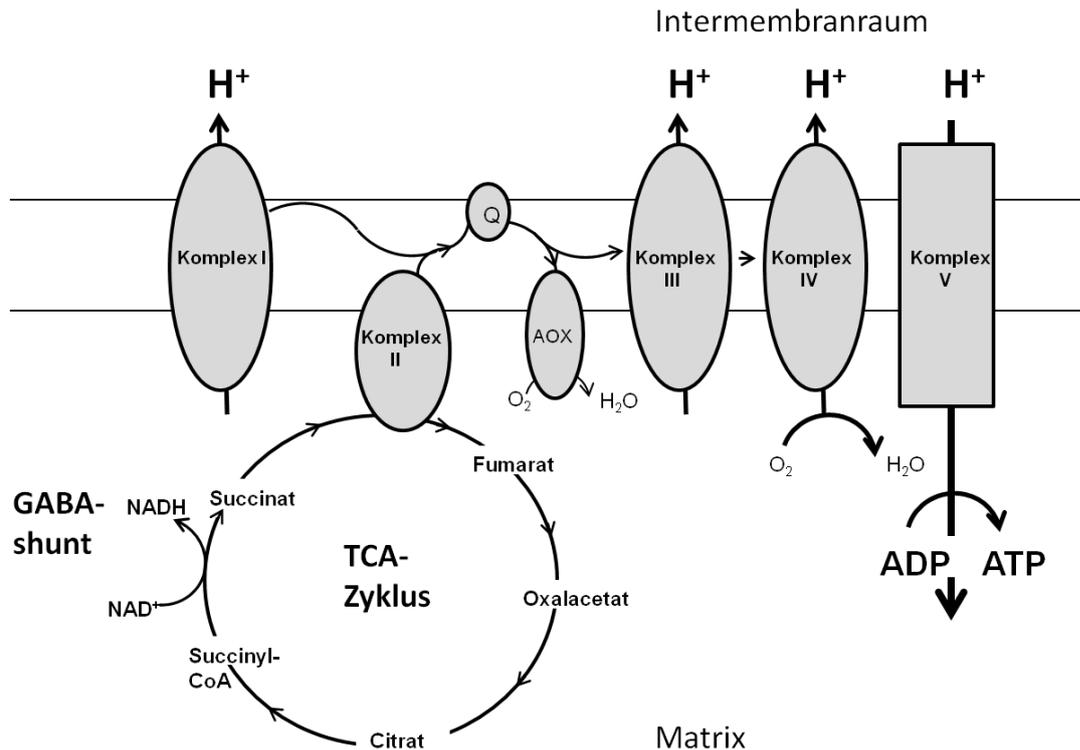


Abbildung 4 Erzeugung von ATP durch oxidative Phosphorylierung. Die Komplexe I, III und IV pumpen Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum. Der erzeugte Protonengradient wird im Komplex V zur Generierung von ATP eingesetzt. Der Elektronenfluss findet dabei von Komplex I und II auf Ubiquinon statt (Q) und von dort aus weiter zum Komplex III und anschließend zum Komplex IV. Die Alternative Oxidase (AOX) ist ein Sonderfall der mitochondrialen Atmung. Die AOX ermöglicht es, Elektronen vom Ubiquinon direkt auf Sauerstoff zu übertragen. Die AOX abhängige Atmung überbrückt die Komplexe III und IV. Komplex II ist im Metabolismus von Succinat im TCA-Zyklus beteiligt. Die Metabolisierung von Glutamat durch den GABA-shunt führt zu einer Freisetzung von NADH sowie Succinat, welches direkt in den Komplex II eingebracht wird.

Die Atmungskette in *Podospira anserina* nimmt Einfluss auf die Seneszenz. Wird die Cytochrom-c-Oxidase ausgeschaltet, findet eine vermehrte Atmung über die AOX statt, was zu einer verlängerten Lebensspanne führt. Diskutiert wird eine geringere ROS-Produktion bei vermehrter AOX-Rekrutierung (Dufour *et al.* 2000). Die Bedeutung von mitochondrial erzeugter Energie für die Virulenz eines phytopathogenen Pilzes ist bisher noch nicht beschrieben worden.

1.12. Zielsetzung

Fusarium graminearum ist ein bedeutendes Pathogen der gemäßigten Breiten. Die Bildung von Trichothecenen führt zu einem beträchtlichen volkswirtschaftlichen Schaden. Die Erforschung der frühen Infektionsbiologie ermöglicht es, Mechanismen der pilzlichen Virulenz zu verstehen und damit Ansätze für die Resistenzzüchtung zu liefern.

Aufgrund der Bedeutung des Rachisknotens für die Toxininduktion sowie der Rolle als zentrales Element der Pflanzenverteidigung, ist dieser Gewebeabschnitt eine wichtige Schaltstelle für den Verlauf einer Weizenblüteninfektion (Proctor *et al.* 1995, Voigt *et al.* 2005, Jansen *et al.* 2005, Ilgen *et al.* 2009). Die metabolischen Veränderungen in dieser Geweberegion sind bisher unbekannt und sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Beschreibung der Veränderungen der globalen Primär- und Sekundärstoffwechselkreisläufe sowie die Charakterisierung von Mutanten des 4-Aminobuttersäure (GABA)-Metabolismus. Um die Bedeutung des GABA-Metabolismus für eine erfolgreiche Infektion zu klären, wurden Deletionsmutanten hergestellt und biochemisch sowie molekularbiologisch untersucht. Im Zuge dieser Arbeit soll die Bedeutung von GABA für die mitochondriale Respiration und für eine erfolgreiche Pflanzeninfektion herausgearbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1. *F. graminearum* Stämme und generelle Kulturbedingungen

Eingesetzt wurde der *F. graminearum* Wildtyp-Stamm 8/1 (Miedaner *et al.* 2000). Die Bildung von Konidien wurde in Weizen-Flüssigmedium (siehe Kulturmedien) bei 28 °C unter Schütteln für eine Woche induziert. Die gebildeten Konidien wurden gewaschen und über 100 µm Siebe filtriert. Jeder eingesetzte Stamm wurde als Konidienstock in wässriger Lösung bei -70 °C gelagert. Für die Extraktion von genomischer *F. graminearum* DNA wurde eine YPG-Kultur (siehe Kulturmedien) für 3 Tage bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Das Myzel wurde anschließend zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und lyophilisiert. Für die Isolierung von genomischer *T. aestivum* DNA wurde 10 mg lyophilisiertes gemörserte Ähren eingesetzt. Die Proben wurden in einer Retsch-Mühle (Retsch, Haan, Deutschland) mit einem 1 mm Siebring-Einsatz gemörsert.

2.2. Eingesetzte Kulturmedien und Bedingungen

Für die Substrat-Nutzung in Festmedien wurden 92 mm Petrischalen eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben, wurde immer 20 ml Medium für eine Petrischale eingesetzt. 1 Liter Minimalmedium besteht aus:

10 ml Lösung B (20 g l⁻¹ KH₂PO₄; 25 g l⁻¹ MgSO₄ × 7H₂O; 10 g l⁻¹ NaCl)

10 g Saccharose,

1 ml Lösung D (60 g l⁻¹ H₃BO₃; 390 mg l⁻¹ CuSO₄ × 5H₂O; 13 mg l⁻¹ KI; 60 mg l⁻¹ MnSO₄ × H₂O; 51 mg l⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O; 5.48 g l⁻¹ ZnSO₄ × 7H₂O; 932 mg l⁻¹ FeCl₃ × 6 H₂O).

5 mM einer Stickstoffquelle (Endkonzentration).

Für das Medium wurde Lösung B zusammen mit MilliQ-Wasser autoklaviert (für die Herstellung von Festmedien wurde 1,6 % granulierter Agar vorher hinzugegeben). Die Stickstoffquellen sowie die Saccharose wurden steril filtriert. Lösung D wurde anschließend unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. In der Folge wird ein Mini-

malmedium nach der jeweiligen einzigen Stickstoffquelle als Stickstoffquelle-Minimalmedium- bezeichnet (z. B. GABA-Minimalmedium, GABA-MM).

Um verschiedene Kohlenstoffquellen zu überprüfen, wurde das Medium ohne Saccharose als Kohlenstoffquelle, aber mit 5 mM NaNO₃ als Stickstoffquelle hergestellt. Als Kohlenstoffquelle wurde anschließend die zu testenden Substanzen hinzugegeben. Alle Platten wurden, sofern es in den Bildunterschriften nicht anders angegeben wurde, mit Agarstücken aus CM (Complete medium)-Vorkulturen (3 Tage alt) oder mit 10 µl einer 100 Konidien µl⁻¹ Konidien-Lösung inokuliert. Es wurden mindestens drei unabhängige $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sowie mindestens zwei unabhängige Δgta_1 - und Δgta_2 -Mutanten mit jeweils mindestens drei technischen Wiederholungen getestet.

Für die Herstellung von 1 Liter CM-Medium wurde 0,1 % Hefe-Extrakt, 0,1 % Casein zusammen mit 800 ml VE-Wasser autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium wurde 1,6 % granulierter Agar hinzugegeben. Im Anschluss wurde Lösung A (1 g Ca(NO₃)₂ x 4H₂O pro Liter Medium, angesetzt als 100fache Stammlösung) 10 ml Lösung B (siehe oben) sowie 1 % D-Glukose steril filtriert und zu dem Medium gegeben. Abschließend wurde 1 ml Lösung D (siehe oben) unter sterilen Bedingungen hinzugegeben und das Endvolumen auf 1 Liter mit sterilem VE-Wasser eingestellt. Antibiotika oder zu testende Substanzen wie z. B. H₂O₂ wurden nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C hinzugegeben.

Die Herstellung von Karotten-Festmedien zur Fruchtkörper-Induktion erfolgte wie bei Cavinder *et al.* 2012 beschrieben. Es wurden 400 g frische Karotten eingesetzt. Die Karotten wurden gewaschen und geschält. Anschließend wurden die Karotten kurz mit VE-Wasser in der Mikrowelle erwärmt und daraufhin in einem Waring-Blender zerkleinert (Waring Products, Connecticut, Vereinigte Staaten von Amerika). Die zerkleinerten Karotten wurden anschließend durch eine Gaze filtriert und das Filtrat wurde mit VE-Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Für die Herstellung von Festmedien wurde 1,6 % granulierter Agar vorher hinzugegeben. Das Medium wurde autoklaviert und in 92 mm Petrischalen gegossen. Die fertigen Platten wurden mit 1000 Konidien inokuliert und für 5 Tage bei 25 °C und einer Photoperiode von 16 Stunden mit UV-A Lampen und normalen Lampen inkubiert. Im Anschluss wurde das Myzel mit 4 ml einer 2,5 % Tween 60 Lösung (in Wasser gelöst) entfernt. Die Platten wurden anschließend 3 Wochen inkubiert. Neu auftretendes Luftmyzel wurde mit 2,5 % Tween 60 Lösung entfernt.

Für die Kultivierung von *F. graminearum* in Flüssigkultur wurde ein YPG-Medium verwendet. Dieses besteht aus 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton sowie 2 % Glukose. Alle Bestandteile wurden zusammen autoklaviert.

Die Herstellung des Zellwand-Extraktes wurde nach der Methode von Sposato *et al.* 1995 durchgeführt. Ca. 100 g Weizenblätter wurden lyophilisiert und anschließend in einer Retsch-Mühle mit einem 1 mm Siebring zerkleinert. Das zerkleinerte Material wurde 1 h bei Raumtemperatur in 0,1 M KH_2PO_4 pH 7 gerührt. Die Suspension wurde anschließend durch 8-Lagen Gaze gefiltert und wieder in Phosphatpuffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Filtrat jeweils zweimal mit Wasser, Methanol, Methanol:Chloroform (1:1, v/v) nacheinander gewaschen. Zwischen jedem Schritt wurde die Suspension durch 8-Lagen Gaze gefiltert. Vorhandene Pigmente wurden durch einen Methanol-Waschschrift entfernt. Anschließend wurde das Filtrat zweimal mit Aceton gewaschen und filtriert. Aceton Rückstände wurden bei Raumtemperatur unter dem Abzug über Nacht verdampft.

Für die Hefe-Transformation wurde zur Selektion SD-Urea angesetzt. Dieses bestand aus:

- 20 g Glukose

- Difco Hefe-Stickstoff ohne Aminosäuren

- Ura DO Zusatz (Clontech Laboratories, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika)

Alle Bestandteile wurden zusammen autoklaviert.

2.3. RNA Isolation und qRT-PCR Bedingungen

Für die Isolierung von mRNA unter GABA induzierenden Bedingungen wurde eine YPG-Vorkultur gewaschen und mit einem 100 μM Sieb filtriert. Anschließend wurde 1 g halbtrockenes Myzel in ein Minimalmedium mit 5 mM GABA als einziger Stickstoffquelle überführt. Nach zwei Stunden wurde das Myzel gewaschen und filtriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Myzel lyophilisiert. Die RNA-Isolation erfolgte mit Trifast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurde nach Homogenisation mit Trifast die Probe bei 12.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, um Polysaccharide, Fette und genomische DNA zu entfernen. Die erhaltene RNA wurde mittels DNaseI in einem 20 μl Ansatz

nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verdaut. Für die RT-PCR wurde „RevertAid Reverse Transcriptase“ (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die erhaltene cDNA wurde mittels der Primerkombination 43 und 44 (Tabelle 1) auf die Anwesenheit von genomischer DNA getestet. Liegt genomische DNA als Template vor, wird ein Bereich von 772 bp amplifiziert. Im Gegensatz dazu wird bei der Amplifikation von cDNA eine Fragmentgröße von 495 erreicht.

Die qRT-PCR wurde mit SYBR-Green „LightCycler 480 SYBR Green I Master“ durchgeführt (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Folgendes qRT-PCR Programm wurde eingesetzt: Inkubation für 2 min bei 50 °C, anschließend 5 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 15 sec, Annealing bei 55 °C für 30 sec und 72 °C für 30 sec für die Elongation. Um die Spezifität des amplifizierten Produkts zu überprüfen, wurde im Anschluss eine Schmelzkurven-Bestimmung durchgeführt.

Alle Messungen wurden mit 3 technischen Replikaten und zwei biologischen Mutanten durchgeführt. Relative Expressionsänderungen wurden mit dem Programm REST-348 (Relative Expression Software Tool; Pfaffl *et al.* 2002) berechnet.

Tabelle 1 Eingesetzte Primer: Kleingeschriebene Sequenzen stellen Überhänge zur Klonierung des jeweiligen Konstrukts dar.

Primer Nummer	Sequenz	Bemerkungen
Gen-interne Primer für die DIG-Sonden		
1	ACCAATGTTACACCCAAAGTC	Internes Fragment FGSG_05554 fw
2	GCACTCTGACCAAGAAGCAC	Internes Fragment FGSG_05554 rev
3	CTTCTTTCACCGAGAACGCC	Internes Fragment FGSG_06751fw

Material und Methoden

4	ATCGACGATGTAGTTATCGTGAG	Internes Fragment FGSG_06751rev
5	CCCTTTGATCCACCTGAACTC	Hygromycin Internes Fragment fw
6	GAAGAAGATGTTGGCGACCT	Hygromycin Internes Fragment rev
7	CTCTTGACGACACGGCTTAC	Nourseothricin Internes Fragment fw
8	CGTTGACGTTGGTGACCTC	Nourseothricin Internes Fragment rev
Primer für die Synthese von FGSG_05554 mit Nat		
9	ggccccctcgaggtcgacggtatcgatGAGCAGAGCAAGGGTCTAC G	5'r fragments fw 05554
10	acatgagcatgccctgcccctgagcggcc ATCTGTGAGAAGCTGATTGCG	5' fragment rev 05554
11	cccgaatcgggaatcggctctagagtag GAGGTATGGTTCGGTCTTGTC	3' fragment fw 05554
12	gctctagaactagtgatccccgggctgCGGAATCAACTGCAATTCTG	3' fragment rev 05554
Primer für die Synthese von FGSG_05554 mit Hyg		
13	ggccccctcgaggtcgacggtatcgatAGACTTCTGAGAAGATGA- GAG	5' fragments fw 05554
14	gagggcaaaggaatagatagtagatgccgCAAGGCATCAAATCAAACGT	5' fragment rev 05554
15	gctccaagcggagcaggctcgacgtattAGCGTGTGGTCATGA- TAAGGG	3' fragment fw 05554
16	gctctagaactagtgatccccgggctgAACGATATCGAGGTGTA- CACG	3' fragment rev 05554
Primer für die Synthese von FGSG_06751 mit Nat		
17	ggccccctcgaggtcgacggtatcgatATGCTTAGACCAGGCTTCTC	5' fragment

Material und Methoden

		06751fw
18	gagggcaaaggaatagagtagatgccgTATTGGGAACACCTCAGGGA	5' fragment 06751 rev
19	gctccaagcggagcaggctcgacgtattGGAAAGAGACTTAAGAT- GACC	3' fragment 06751 fw
20	gctctagaactagtgatccccgggctgCCGACATTCATTCATCACC	3' fragment 06751 rev
Real-time Primer		
21	GACGATCTGCTATTCTCCCT	FGSG_00743 fw SD Succinat- Dehydrogenase Präkursor
22	AAGTCCAGTGGTAAGAACCG	FGSG00743 rev Succinat- Dehydrogenase Präkursor
23	AAGACCCAAACCTTGAAGGA	FGSG_01422 fw Citrat- Synthase
24	CGTAAACCTGGTCAAGAGTG	FGSG_01422 rev Citrat- Synthase
25	CTTCTTTCACCGAGAACGCC	FGSG_06751 <i>gta2</i> fw
26	ATCGACGATGTAGTTATCGTGAG	FGSG_06751 <i>gta2</i> rev
27	CAAGACCAAGAGCCACATGG	FGSG_05554 <i>gta1</i> fw
28	AATCTGAGCGAAGACGTCGA	FGSG_05554 <i>gta1</i> rev
29	CTTACATGGAAGATGAAGCCGA	FGSG_01572 GAD fw
30	TCATGTTAACGCATCGGTTCTG	FGSG_01572 GAD rev
31	GTTATCGAGCTTGCCAATGAC	FGSG_06752 SSADH-1 fw

Material und Methoden

32	CTGAGTACACCGCAGTTGAC	FGSG_06752 SSADH-1 rev
33	AAGTGAATGATCCTTCAACTGGC	FGSG_11843 SSADH-2
34	GGAATGAAGGGAACGCATCAG	FGSG_11843 SSADH-2
35	CTACCACAAGGAGGTCATTTCTG	FGSG_04196 SSADH-3 fw
36	GGCAGTAGAAGGCTCAAAGAC	FGSG_04196 SSADH-3 rev
37	ACCGATCCCAAGAATTTCCC	Tri4 fw
38	CAAAGGCCATAGTGTATCCGA	Tri4 rev
39	ACTTGTCAACGAGCACTTTCC	Tri45 fw
40	ACTGCTCAATCCAACATCCCT	Tri5 rev
41	TACTCAGAATGCCCTCAGTCAG	Tri6 fw
42	GTTGTCCTTCCTTGTCTTGCC	Tri6 rev
43	GGTGGAGAAGATGACCAAGGA	ACC Oxida- seQPCRfw
44	AAGAAGGTGCTCTCCCAGTC	ACC Oxida- seQPCRrev
45	TCATCTGCGACGAGATCTACG	ACC Synthase QPCRfw2
46	AATCCTTGGAGAGGCTGTAGG	ACC Synthase QPCRrev2
47	ATCATCCTGTGTTGCTGACTG	Weizen Actin fw
48	GATTGCGACATACATTGCTGG	Weizen Actin rev
49	TGCTGTTCTGGTCGATCTTG	β -Tubulin fw
50	ATGAAGAAGTGAAGTCGGGG	β -Tubulin rev
51	GGAAAGCCAGAACCAAACAA	FGSG_06554 Katalase 1 fw
52	CGTTGACGAGAGTGTAGGTGTTGA	Katalase 1 rev
53	GCTTGGGCTTCTGCTTCTACTTTC	FGSG_02974 Katalase 2.1 fw
54	GCCTTGCCGTTGGACTGA	Katalase 2.1 rev

Material und Methoden

55	ATCTTATTGTTCTCGGCGGTGTTG	FGSG_012369 fw Katalase 2.2
56	CGAGCAGTTCCGTGTCCATAGTT	Katalase 2.2 rev
57	TCAACCGTCCTCTGTCTCCTATCC	FGSG_06733 Katalase 3 fw
58	AGCCTTTTCCTTGTGTCTGGTT	Katalase 3 rev
Primer zur Generierung der Lokalisations-Vektoren		
59	ttgtaaacgacggccagtgagcgcgcgtGTTCATACAATAGATGCGGG A	FGSG_05554 Promotor und kodierende Se- quenz fw
60	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccCTGCTTGACAATCTTCTCA AC	FGSG_05554 Promotor und kodierende Se- quenz rev
61	ggagctggtgcaggcgtggagccggtgccATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG	GFP-GA Linker fw
62	GCAGGTCGACCATATGGGAGcagcccggggatccactagttagag cg	GFP-GA-Linker rev
63	ttgtaaacgacggccagtgagcgcgcgtTTCTTGCTTACAATTCCTTC GG	FGSG_06751 Promotor und kodierende Se- quenz fw
64	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctccCATAGCACCAAT- GACCTTGTC	FGSG_06751 Promotor und kodierende Se- quenz rev
Primer zur Überprüfung der cDNA Synthese		
65	GTTGTATCTGTGACCCTTGTTGAG	Internes Frag- ment aus FGSG_00845 fw
66	GATGTCGTTGCCTTCCTCCT	Internes Frag- ment aus FGSG_00845 fw

2.4. Erstellung der Vektoren

Grundlegende molekulare Methoden wurden, wie in Sambrook und Russell beschrieben (2001), durchgeführt. Die Vektoren wurden mittels Hefe-Rekombinations-Klonierung erzeugt (Colet *et al.* 2006). Alle Gen-Deletionen wurden mittels eines Doppelten-Crossingovers durchgeführt. Flankierende Sequenzen der jeweiligen kodierenden Sequenz wurden mittels PCR von genomischer *F. graminearum* DNA amplifiziert. Für FGSG_05554 wurde Flanken von 618 bp (Primerkombination 9 und 10) für die 5'-Flanke sowie 626 bp für die 3'-Flanke (11 und 12) amplifiziert mit überlappenden Sequenzen zum pRS426 Vektor (Christianson *et al.* 1992) sowie für eine Nourseothricin-Resistenz-Kassette, die aus dem OliC-Promotor sowie der kodierenden Sequenz bestand. Für FGSG_06751 wurde 558 bp für die 5'-Flanke (Primerkombination 17 und 18) sowie 588 bp für die 3'-Flanke (Primerkombination 19-20) amplifiziert. Die überlappenden Sequenzen entsprechen den vorherig verwendeten. Zur Klonierung eines FGSG_06751 Deletionsvektors mit Hygromycin-Resistenz wurden Primer mit Überhängen zu einer Hygromycin-Resistenzkassette eingesetzt (Abbildung 13).

Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: 94 °C (Primerkombinationen: 13 und 14 sowie 15 und 16) für 4 min, gefolgt von 35 Zyklen 94 °C für 30 sec, 55 °C für 30 sec und 72 °C für 60 sec. Im Anschluss erfolgte ein finaler Elongationsschritt bei 72° C für 10 min sowie eine Lagerung bei 4° C. Die Nourseothricin- sowie Hygromycin-Kassetten wurden ausgeschnitten aus den Vektoren pNR1 (Malonek *et al.* 2004) sowie aus dem Vektor pan7-1 (Punt *et al.* 1987). Alle Fragmente wurden über ein Agarosegel isoliert. Für die Erstellung der Doppelmutanten wurde eine bestätigte Einzelmutante (FGSG_05554; 1357.6) mit einem Deletionsvektor für FGSG_06751 mit einer Hygromycin-Kassette transformiert.

Zur Generierung der Lokalisations-Vektoren wurde ca. 1000 bp der Promotorregion des jeweiligen Gens sowie die kodierende Sequenz (ohne Stoppcodon) amplifiziert (Abbildung 5). Zu diesem Zweck wurde mithilfe der Primerkombination 59 und 60 die Promotor und kodierende Sequenz von *gta-1* sowie mithilfe der Primerkombination 63 und 64 die Promotor- und kodierende Sequenz von *gta-2* amplifiziert.

2.5. Hefe-Rekombinationsklonierung

Der pRS426 Vektor wurde mit *EcoRI* sowie *HindIII* über Nacht verdaut und über ein Agarosegel isoliert. Hiernach wurde eine 5 ml YPD-Flüssigkultur mit dem Hefestamm FGSC 9721 (FY 834) (Winston *et al.* 1995) über Nacht bei 150 rpm und 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml einer YPG-Flüssigkultur mit 3 ml der Übernachtskultur inokuliert und für 4 Stunden bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml sterilem MilliQ Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert für 5 min und 2000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen (es wurde eine sterile 1M Stammlösung frisch angesetzt). Der Ansatz wurde für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 400 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Hiernach wurde unspezifische DNA (Heringssperma ($2\mu\text{g ml}^{-1}$)) für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend bei 4 °C gelagert. In Reaktionsgefäßen wurde anschließend angesetzt:

- 240 µl 50 % PEG 3350 (frisch angesetzt und steril filtriert, w/v)
- 36 µl 1 M Lithiumacetat
- 1,5 µl verdauter pRS426 Vektor (ca. 100 ng)
- 5,0 µl der vorher amplifizierten PCR-Fragmente (ca. 400 ng pro Fragment)
- 5,0 µl der jeweiligen Resistenzkassette (ca. 400 ng)
- 50 µl denaturierte Heringssperma DNA (2 mg ml^{-1})
- 50 µl der Hefe-Suspension

Der gesamte Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 30 °C inkubiert. Hiernach wurde der gesamte Ansatz für 15 min bei 45 °C inkubiert. Folgend wurden der Ansatz bei Raumtemperatur bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl MilliQ aufgenommen. 20 µl des Ansatzes wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und auf ein Sollvolumen von 200 µl mit MilliQ Wasser aufgefüllt. Sowohl die Verdünnung als auch der unverdünnte Ansatz wurden auf jeweils eine SD-Ura-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden im Anschluss bei 30 °C für 2 Tage inkubiert. Die gesamte Transformation wurde immer mit einer Positivkontrolle (unverdauter pRS426 Vektor) sowie einer Negativkontrolle (geschnittener pRS426 Vektor) durchgeführt. Nach zwei Tagen wurden Transformanten in ein SD-Ura-Flüssigmedium (50 ml) überführt und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.6. Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Die 15 ml der SD-Ura-Kulturen wurden für 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl MilliQ resuspendiert. Im Anschluss wurde nacheinander

200 µl Hefe-Lysis Puffer (4ml Triton x-100, 20 ml 10 % SDS, 4 ml 5 M NaCl, 500 µl 0,5 M EDTA, 2ml 1 M Tris)

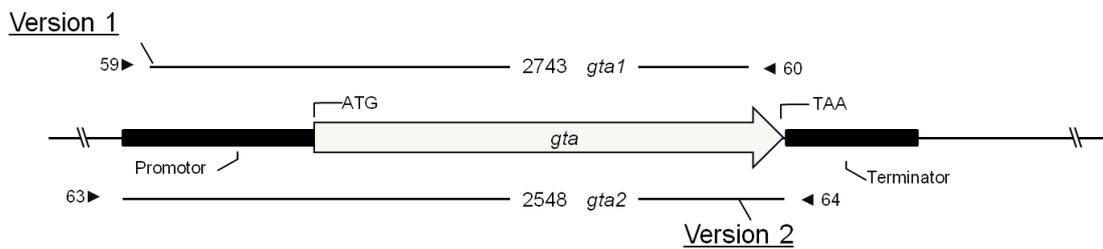
200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1)

300 mg (ca. zwei Spatelspitzen) Glaskugeln (435-600 µm)

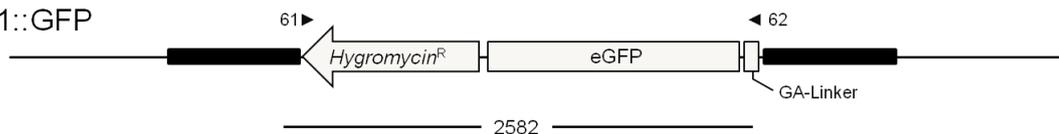
hinzugegeben und der gesamte Ansatz für 10 min vermischt. Im Anschluss wurde 200 µl Tris-EDTA (pH 8,0) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde 1:10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 1 ml 96 % Ethanol hinzugegeben und für 15 min bei 20 °C inkubiert. Hiernach wurden die Zellen für 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde aufgenommen in 400 µl TE-Puffer und mit 4 µl RNase A (10 mg ml⁻¹) versetzt. Der gesamte Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert, bis das Pellet aufgelöst war (ca. 20-30 min). Im Anschluss wurde 10 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 96 % Ethanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde 20 µl MilliQ Wasser hinzugegeben. 8 µl dieses Ansatzes wurde eingesetzt, um chemisch kompetente *E. coli* Zellen des Stammes DH5α zu transformieren. Nachfolgend wurde die Plasmide mittels alkalischer Lyse aus *E. coli* isoliert (Sambrock und Russel 2001). Plasmide mit den richtigen Insert-Größen nach Verdau (Abbildung 11, Abbildung 12) wurden zur Transformation von *F. graminearum* Protoplasten eingesetzt.

Mittels PCR wurde aus dem H1::GFP Vektor die kodierende GFP-Sequenz sowie die Hygromycin-Resistenzkassette amplifiziert (Abbildung 5). Die amplifizierten Sequenzen wiesen am 3' Bereich eine homologe Sequenz zum pRS426 Vektor und am 5' Bereich eine homologe Sequenz zu einem GA-Linker des H1::GFP Vektors (Dr. Ana Lilia Martínez-Rocha, Universität Hamburg). Die Vektoren wurden zur Transformation des Wildtyp-Stammes eingesetzt.

A. Genomische DNA



B. H1::GFP



C. Protein-Lokalisationsvektor

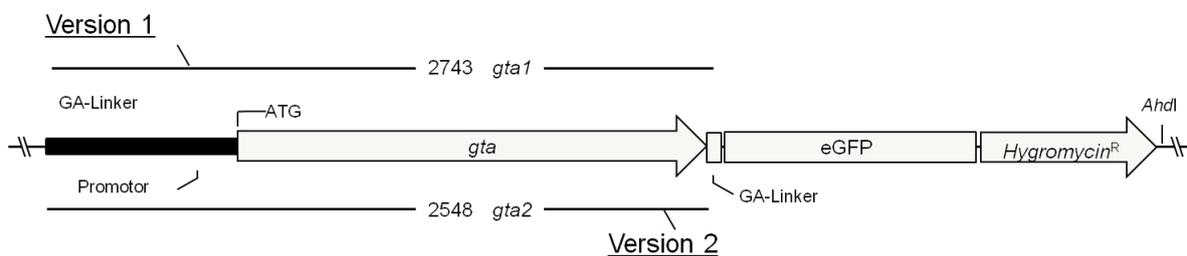


Abbildung 5 Vektor-Klonierung und für die Lokalisation von *gta-1* und *gta-2* Genotyp von *gta-1* (Version 1) und *gta-2* (Version 2). **A.** Die kodierende Sequenz der jeweiligen Transaminase sowie die Promotorregion wurde mithilfe der Primerkombinationen 59 und 60 (*gta-1*) sowie 61 und 62 (Tabelle 1) (*gta-2*) amplifiziert. **B.** Aus dem H1::GFP Vektor wurde mithilfe der Primer 61 und 62 der GA-Linker, die eGFP kodierende Sequenz sowie die Hygromycin-Resistenzkassette amplifiziert. **C.** Beide Fragmente wurden mittels Hefe-Rekombinationsklonierung fusioniert. Generierte Vektoren wurden mit *AhdI* verdaut und zur Transformation des Wildtyps eingesetzt. Die Integration erfolgte ektopisch ohne Homologie. Das fertige Konstrukt besteht aus dem nativen Promotor, der kodierenden Sequenz der jeweiligen Transaminase (*gta-1* und 2), fusioniert mit dem GA-Linker und der eGFP kodierenden Sequenz. Zur Selektion ist eine Hygromycin- Resistenzkassette integriert.

2.7. Southern-Blotting

Genomische DNA des Wildtyps sowie der Deletions-Stämme wurde isoliert und mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (FGSG_05554) und *HindIII* (FGSG_06751) verdaut. Die genomische DNA der Doppelmutanten wurde verdaut mit *HindIII*. Es wurden jeweils ca. 20 µg mit 20 Einheiten Restriktionsenzyme in einem 500 µl Ansatz über Nacht verdaut. Die verdaute DNA wurde gefällt und anschließend in einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend sukzessive in Depurinatlösung (0,25 N HCL), gefolgt von Denaturierungslösung (0,5 M NaOH und 1,5 M

NaCl), gefolgt von Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl) für jeweils 10 min inkubiert. Für den Aufbau des Blots wurde zuerst eine Brücke aus Whatman-Papier in eine Schale gefüllt mit 2fach SSC (hergestellt aus 20fach SSC: 175,2 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat in 1 l) gelegt. Der Aufbau des Blots erfolgte von unten nach oben in folgender Orientierung: Zuerst die Brücke, anschließend das Gel, in der Folge eine Hybond-NX Membran (Amersham Biosciences, Little Chalfont, U.K), anschließend 3 Lagen Whatman-Papier, anschließend eine große Menge saugfähigen Papiers. Beschwert wurde der Blot durch ein Gewicht (ca. 500 g). Etwaige Berührungsstellen zwischen der 2fach-SSC-Lösung und der Membran oder dem Papier wurden abgedeckt. Der Kapillar-Transfer fand über Nacht statt. Anschließend wurde die Membran mit 2fach SSC kurz gewaschen. Im Anschluss wurden die DNA auf der Membran mit einem UV-Crosslinker (Stratagene, La-Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika) fixiert.

Die Membran wurde danach mit 2fach SSC in einer Hybridisierungsröhre gewaschen. Anschließend wurde das 2fach SSC verworfen und 25 ml Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 0,1 % N-Lauryl-Sarkosin, 0,2 % SDS, 2 % Blockierungsreagenz (siehe unten) hinzugegeben. Die Prähybridisierung erfolgte für minimal 6 Stunden bei 68 °C unter ständigem Drehen der Röhre in einem Hybridisierungssofen. Hiernach wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und 25 ml der Hybridisierungslösung hinzugegeben (Herstellung wie die Prähybridisierungslösung, zusätzlich mit einer DIG-markierten PCR Sonde des jeweiligen Zielgens). Die DIG-Sonde wurde nach Angaben des Herstellers mittels PCR amplifiziert (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Das Blockierungsreagenz wurde in beiden Fällen in 1fach B1 gelöst. B1 wurde als 5fach-Konzentrat bestehend aus 58,05 g Maleinsäure mit 43,83 g NaCl pH 7,5 eingestellt mit NaOH hergestellt. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 68 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 50 ml W1 (2 x SSC 0,1 % SDS) zweimal jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit auf 68 °C vorgewärmten W2 (0,2 x SSC, 0,1 % SDS) zweimal 15 min bei 68 °C gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran einmal mit der Lösung WP (1 x B1, 0,3 % Tween 20) gewaschen. Darauffolgend wurde 15 ml B2 (1 x B1 mit 1 % Blockierungsreagenz) hinzugegeben und die Membran für 60 min inkubiert. Die Lösung wurde ausgetauscht durch AK-Lösung (B2 mit 1:10.000 verdünnten Anti-Digoxegenin-AP Fab Antikörpern). Die Inkubation dauerte 30 min. Anschließend wurde die AK-Lösung verworfen und die Membran dreimal für jeweils 20 min mit WP-

Lösung gewaschen. Darauffolgend wurde die Membran für 5 min in 10-15 ml B3 (100 mM mm Tris-HCl pH 9,5 100 mM mm NaCl) inkubiert. Als Substrat wurde anschließend 500 µl CSPD-Lösung (Chemilumineszenz Reagenz, 1:100 verdünnt in B3) hinzugegeben. Die Membran wurde anschließend für 10 min bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in eine Plastikhülle eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C erneut inkubiert. Darauffolgend wurde ein Röntgenfilm in einer Dunkelkammer auf die Membran gelegt und für minimal 30 min belichtet.

Hiernach wurde die gebundene Sonde entfernt und mittels einer zweiten Sonde, welche homolog zur jeweiligen Resistenzkassette war, die Anzahl der integrierten Vektor-Kopien überprüft. Die vorher gebundene Sonde wurde mittels eines Stripping-Puffers (0,2 M NaOH mit 0,1 % SDS) entfernt. Die Membran wurde zweimal für je 15 min bei 37 °C mit dem Stripping-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran zweimal mit 2fach SSC gewaschen. Darauffolgend begann das Protokoll wieder bei der Prähybridisierung.

2.8. Protoplasten-Transformation von *F. graminearum*

Eine 50 ml YEPD-Vorkultur (3 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Pepton, 20 g Glukose l⁻¹) wurde mit 1×10⁶ Konidien inokuliert und über Nacht bei 28 °C und Schütteln inkubiert. Das Myzel wurde mit 100 µm Sieben filtriert und mit 200 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Myzel auf einen Stapel sterilen Whatman-Papiers transferiert. Der Enzymmix (5,0 % Driselase, 3,5 % lytische Enzyme in 0,7 M NaCl) wurde angesetzt und für 30 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung bei 4100 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. 0,5 Gramm des Myzels wurde mit der Enzymlösung in einem 100 ml Erlenmeyer-Kolben für 1 Stunde und 30 min bei 30 °C und 80 rpm inkubiert. Die Protoplasten wurden sukzessive zuerst durch ein 100 µm Sieb, anschließend durch ein 40 µm Sieb gefiltert. Im Anschluss wurden die Protoplasten bei 10 min bei 2000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Protoplasten wurden alsdann mit STC-CO Puffer gewaschen (20 % Saccharose, 10mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM CaCl₂). Die Protoplasten wurden erneut zentrifugiert und in einer Konzentration von 1×10⁸ ml⁻¹ in STC-CO aufgenommen. Für die Transformation wurden ca. 2×10⁷ Protoplasten eingesetzt und mit 10 µg Plasmid DNA bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG-CO Lösung (40 % PEG4000, 60 % STC) hinzugegeben und für 20 min ohne Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde 5 ml TB3 (200g Saccharose, 3 g Hefe-Extrakt, 3 g Säure-hydrolysiertes Casein l⁻¹) hinzugegeben und die Lösung wurde für 30 min inkubiert. Anschließend wurde 1,5 % TB3 Agar (ca. 50 °C) hinzugegeben auf eine Endkonzentration von 50 ml. Im Anschluss wurde für 5 x 96 Petrischalen jeweils 10 ml der Lösung eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die Platten mit 10 ml Wasseragar mit dem jeweiligem Antibiotikum überschichtet (100 µg/ml für alle eingesetzten Antibiotika). Anschließend wurde die Platten mit 10 ml Selektionsagar (1,2 % granulierter-Agar in Wasser mit entweder Hygromycin oder Nourseothricin) überschichtet. Die Platten wurden anschließend bei 28 °C inkubiert, bis Kolonien auf der Oberfläche sichtbar waren (ca. 2-3 Tage). Die Kolonien wurden anschließend auf CM-Selektionsagarplatten (100 µg/ml des jeweiligen Antibiotikums) überführt.

2.9. Untersuchung der Virulenz auf Weizen

Das anfällige Weizenkultivar *Nandu* (Lochow-Petkus, Bergen-Wohlde, Deutschland) wurde für alle Untersuchungen der Virulenz eingesetzt. Weizenpflanzen wurden in einer Wachstumskammer für ca. 6 Wochen bei 18-20 °C mit 60 % relativer Feuchte und einer Photoperiode von 16 Stunden angezogen. Für die Infektion der Pflanzen wurden Konidien Aliquots (100 c/µl) eingesetzt. Die Pflanzen wurden in der Wachstumsphase 65-69 nach Zadoks inokuliert (Zadoks *et al.* 1974). Die Ährchen wurden zwischen Lemma und Palea mit 600 Konidien punktinokuliert. Als Negativkontrolle diente Wasser als Inokulum. Die infizierten Ähren wurden die ersten drei Tage nach Inokulation mit Plastikbeuteln umhüllt. Anschließend wurden die Plastikbeutel entfernt und die Ähren nach 21 Tagen geerntet. Die Anzahl der Ährchen mit FHB-Symptomen (Nekrosen-Bildung, Ausbleichen) wurde gezählt. Der Prozentwert der jeweiligen Infektion wurde in Relation gesetzt zur Gesamtanzahl der Ährchen pro Ähre. Wasser inokulierte Ähren dienten als Referenzkontrolle. Die statistische Auswertung der Virulenz erfolgte mittels Man Whitney U Test bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$.

2.10. DON-Quantifizierung *in vitro* sowie während der Pflanzeninfektion

300 ml YPG Medium wurde mit 5000 Konidien inokuliert und für 3 Tage lang bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Das Myzel wurde gewaschen und anschließend ge-

wogen. Ein Gramm Myzel (halbtrocken) wurde in ein Minimalmedium mit entweder 5 mM GABA, Putrescin-Dihydrochlorid oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ überführt. Jede DON-Bestimmung wurde mit mindestens zwei unabhängigen Mutanten mit jeweils drei biologischen Wiederholungen sowie jeweils zwei technischen Replikaten bestimmt. Zur Quantifizierung wurde ein kompetitiver ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) nach Herstellerangaben (Ridascreen Fast-DON, R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Gemessene DON-Konzentrationen wurden normalisiert auf das Trockengewicht der jeweiligen Kultur.

Für die Bestimmung von DON während der Weizeninfektion wurden Weizenähren während der Blüte mit Konidien der $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten sowie des Wildtyps inokuliert und nach 5, beziehungsweise 10 Tagen geerntet. Wasserinokulierte Ähren dienten als Kontrolle. Für die Bestimmung der DON-Konzentration nach 5 Tagen wurde die inokulierte Blüte sowie die beiden nach oben und nach unten angrenzenden Blüten isoliert. Für die Bestimmung der DON-Konzentration nach 10 Tagen wurde die gesamte Ähre eingesetzt. Die entfernten Blüten wurden schockgefroren mit flüssigem Stickstoff und anschließend für die DON-Bestimmung nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Alle gemessenen DON-Werte wurden mittels q-PCR auf die gemessene Menge an pilzlichem β -Tubulin normalisiert (Voigt *et al.* 2007).

2.11. pH-Wert Messungen in DON induzierenden Medien

Die Entwicklung des pH-Wertes in jedem DON-Induktionsmedium wurde im zeitlichen Verlauf bestimmt. Jeden Tag wurde der pH-Wert mittels einer in „lab ultra micro Elektrode“ (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) bestimmt. Der Mittelwert wurde berechnet aus mindestens zwei biologischen Mutanten mit jeweils 3 biologischen Wiederholungen pro Mutante.

2.12. Analyse des metabolischen Profils

Für alle LC-GC/MS Analysen wurde das Weizenkultivar *Nandu* eingesetzt und nach der oben beschriebenen Methode infiziert. Der Rachisknoten (Abbildung 7) wurde mittels einer Rasierklinge auf einem vorgekühlten Schneidebrett isoliert. Die gesamte Isolation wurde auf Eis durchgeführt und die isolierten Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Insgesamt wurden ca. 150 Proben isoliert. Das Material wurde bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die weitere Bearbeitung der Proben fand bei der Firma Metabolomic Discoveries (Potsdam-Golm, Deutschland) statt. Das weitere Verfahren erfolgte wie in Lisec *et al.* 2006 beschrieben. Die isolierten Rachisknoten wurden mit Stahlkugeln in 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäßen unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerkleinert (2 min bei 20 Hz). Anschließend wurde 1,4 ml 100 % vorgekühlter Methanol (-20 °C) hinzugegeben und die Proben für 10 s gemischt. Danach wurde 60 µl Ribitol (0,2 mg ml⁻¹ in MilliQ Wasser) als interner Standard hinzugegeben und für 10 s gemischt. Anschließend wurden die Proben bei 70 °C in einem Thermomixer bei 950 rpm geschüttelt. Darauffolgend wurden die Proben für 10 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Schott GL14 Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Chloroform (-20 °C) versetzt. Anschließend wurde 1,5 ml MilliQ Wasser (vorgekühlt bei -4 °C) hinzugegeben und für 10 s vermischt. Die Proben wurden anschließend für 15 min bei 2.200 g zentrifugiert. 150 µl des Überstandes (Polare-Phase) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde anschließend in einer Vakuum-Zentrifuge ohne zusätzliche Heizung eingengt. Bevor die Proben eingefroren wurden, wurde Argon hinzugegeben und die Reaktionsgefäße in einen Plastikbeutel mit Silikat-Trocknungsmittel gegeben. Die Proben wurden vor der Derivatisierung für 30 min zusätzlich in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Anschließend wurde 40 µl Methoxyamination (20 mg ml⁻¹ in 100 % Pyridin, frisch angesetzt) hinzugegeben. Die Proben wurden für 2 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde frische MSTFA-Lösung mit 20 µl⁻¹ Retentionszeiten-Standard (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid) (siehe Lisec *et al.* 2006 für zusätzliche Details) hinzugegeben. 70 µl dieser Lösung wurden zu den Proben gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in GC/MS Probenröhrchen überführt.

Eingesetzt wurde ein Agilent GC-MSD 7590 (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland). Alle statistischen Analysen der GC/MS-Metabolite wurden mit der Software GNU R (R Development Core Team 2008) durchgeführt. Ein Konzentrationsunterschied wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn der p-Wert unter 0,001 nach einem ANOVA-Test lag. Die Signifikanz der LC-GC/MS-Metabolite wurde mittels Student's t Test bestimmt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant verändert angesehen. Die Hauptkomponentenanalyse der Metabolite, die mittels LC-GC/MS detektiert wurden, wurde durchgeführt mit der Software Multibase (Numerical Dynamics) in Microsoft Windows Excel (Microsoft, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika).

2.13. HPLC-Analysen (*in vitro* und von Weizengewebe)

YPG-Vorkulturen wurden gewaschen und ein Gramm Myzel (halbtrocken) wurde in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit GABA-Minimalmedium gegeben. Für jeden Zeitpunkt wurden drei biologische Wiederholungen durchgeführt. Im Zwei-Stunden-Takt wurden Proben aus dem Überstand entnommen sowie das Myzel der drei Kolben filtriert, gewaschen und lyophilisiert. Der Überstand sowie das Myzel wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Bestimmung von GABA im Pflanzengewebe wurden Weizenblüten des Kultivars *Nandu* mit dem Wildtyp sowie drei unabhängigen $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten infiziert. Wasserinokulierte Blüten dienten als Referenzkontrolle. Die Analyse des GABA-Gehalts in infizierten Weizenproben wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. em. Dr. Reinhard Lieberei, Universität Hamburg, AG-Nutzpflanzenforschung durchgeführt. Die isolierten Gewebeabschnitte entsprechen den Regionen, welche für die Bestimmung der DON-Konzentration nach 5, respektive 10 dpi eingesetzt wurden (siehe oben). Die Proben wurden zerkleinert in einer Retsch-Mühle mit einem 1 mm Siebring-Einsatz. Anschließend wurde das gemörserte Material mit 1 ml Wasser:Chloroform:Methanol (3:5:12, v/v/v) vermengt und für 5 min bei 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Probengefäß überführt und in einer Vakuum-Zentrifuge eingengt. Für die Bestimmung im Weizengewebe wurden die gemörserten Proben anschließend in 800 µl 200 mM Borat-Puffer (pH 9,5) aufgenommen. Vor der Injektion wurden 400 µl OPA Reagenz (100 mg Phtaldialdehyd in 2,5 ml Methanol, 22,4 ml Borat-Puffer (pH 9,5) und 100 µl 2-Mercapthoethanol) hinzugegeben. Die

Trennsäule war LiChroCART 250-4 (Lichrospher 100 RP-18 (5 µm, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Elution wurde durchgeführt mit einem Gradienten bestehend aus Lösung A (1600 ml 50 mM Na-Acetat (pH 6,2) mit Essigsäure; 50 ml Methanol, 20 ml Tetrahydrofuran) und Lösung B (200 ml 50 mM Na-Acetat (pH 6,2), 800 ml Methanol). Die Flussrate war 1,3 ml min⁻¹, die Säulentemperatur betrug 30 °C. Das Gradientenprofil ist zusammengefasst in der nachfolgenden Tabelle.

Tabelle 2 HPLC-Gradientenprofil zur Detektion von GABA im Pflanzengewebe. Lösung A (1.600 ml 50 mM Na-Acetat (pH 6,2) mit Essigsäure; 50 ml Methanol, 20 ml Tetrahydrofuran) Lösung B (200 ml 50 mM Na-Acetat (pH 6,2), 800 ml Methanol)

Zeit in Minuten	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0	100	0
2	85	15
15	70	30
21	70	30
40	0	100
45	0	100
50	100	0
55	100	0

Die Detektion wurde mit einem F-1050 Fluoreszenz-Spektrometer mit einer Anregungswellenlänge von 334 nm und einer Emissionswellenlänge von 425 nm durchgeführt. Die Quantifizierung wurde durch Vergleich der Retentionszeit sowie der Peak-Höhen/Peak-Flächen mit einem Aminosäure Standard durchgeführt.

Die Bestimmung der GABA-Konzentration *in vitro* erfolgte nach der von Bor *et al.* (2009) beschriebenen Methode mit Modifikationen. Für die Bestimmung der intrazellulären GABA-Konzentration wurden 25 mg fein gemörstertes Myzel mit 1 ml Wasser:Chloroform:Methanol (3:5:12, v/v/v) vermengt und für 5 min bei 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Anschließend wurden die Proben aufgenommen in 225 µl MilliQ Wasser, 25 µl 0,1 M Kalium-Puffer (pH 8,0) und 250 µl einer 2-Hydroxynaphthaldehyd (0,3 % in 100 % Methanol, frisch angesetzt) Lösung hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 80 °C mit 1000 rpm inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Volumen wurde auf 1 ml mit Methanol eingestellt und die gesamten Proben durch 0,45 µm Filter filtriert. Für die

anschließende Analyse wurden 500 µl in HPLC-Probengefäße überführt. Die HPLC-Trennsäule war Supelco LC18 (250 mm x 4,6 mm x 2.5 mm, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Zur Eluierung wurde 100 % Methanol als organische Phase sowie MilliQ Wasser als wässrige Phase eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Flussrate war 1,5 ml min⁻¹; die Eluation erfolgte ausgehend von 62 % organischer Phase, welche innerhalb von 15 min auf 90 % organische Phase erhöht wurde. Die Temperatur des Auto-Samplers betrug 15 °C, die Temperatur der Trennsäule war 30 °C. Die Detektion wurde bei 330 nm mittels eines „Variable Wavelength“ Detektors (Ultimate 3000, Dionex) durchgeführt.

2.14. Messungen der mitochondrialen Sauerstoffaufnahme

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

5000 Konidien des Wildtyps bzw. der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten wurden in „XF24 Islet capture micro“ Platten mit Filtern in 450 µl Minimalmedium mit 5 mM NaNO₃ (pH 7,4) für 24 h bei 28 °C angezogen. Anschließend wurde das Medium durch frisches NaNO₃ Minimalmedium ausgetauscht und die Platten wurden für 1 Stunde bei 28 °C unter Messung der Sauerstoffaufnahme (eng. Oxygen consumption rate, OCR) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (Abbildung 34), wurden die Kulturen mit den folgenden Substanzen versetzt: (Angabe der Endkonzentration jeweils) A: GABA (50 µl; 5 mM), B: Oligomycin (55 µl; 4 µM), C: FCCP (60 µl; 4 µM), Rotenon und Antimycin (65 µl; 4 µM). Die OCR einer Zelle kann durch die Zugabe von spezifischen Inhibitoren der Atmungskette unterbrochen werden. Dies ermöglicht es, die mitochondriale Effizienz zu bestimmen. Oligomycin inhibiert die F₀-Untereinheit der ATP-Synthase und ermöglicht es daher, die Menge an Sauerstoff, welche für die ATP-Synthese eingesetzt wird, zu bestimmen. Die Entkopplung der Atmungskette durch das Protonophor FCCP (Cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) ermöglicht es, die maximale Leistungsfähigkeit der Atmungskette unabhängig vom Protonengradienten zu bestimmen. Rotenon und Antimycin inhibieren Komplex I und II der Atmungskette und führen zu einem kompletten Einbruch in dem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch.

Die verbliebene OCR ist daher auf nicht-mitochondriale Oxygenase-Reaktionen zurückzuführen. Für die Bestimmung der OCR unter Nicht-Stress-Bedingungen wurde anstatt GABA frisches NaNO₃ Minimalmedium zu den Kulturen gegeben. Alle Messwerte wurden normalisiert auf die Werte des jeweiligen Stammes vor der GABA-Zugabe. Das gesamte Experiment wurde viermal wiederholt mit drei unabhängigen $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's t Test überprüft ($p < 0,05$).

2.15. Epifluoreszenz- und Laser-Scanning-Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der infizierten Weizenblüte wurden nach 10 dpi mit einem Fluoreszenz-Stereomikroskop MZFLIII (Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz) durchgeführt. Die infizierten Blüten wurden longitudinal mit einer Rasierklinge geschnitten. Wasser-inokulierte Blüten dienten als Referenzkontrolle für die Autofluoreszenz. Die Fluoreszenz wurde detektiert mit einer Anregungswellenlänge von 545/30 nm sowie einem Filterset von 620/60 nm. Einzelne Aufnahmen wurden zusammengefügt mittels des „Image Composite Editor“ (Microsoft, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika). Zur Detektion der mitochondrialen Aktivität wurde der Potentialfluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (rhod123) eingesetzt. Hierfür wurden Konidien bei 28 °C unter Schütteln für 24 h in Minimalmedium mit NaNO₃ inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit 5 mM GABA (Endkonzentration) versetzt. Nach einer Inkubation von vier Stunden bei 28 °C und 1000 rpm wurde 10 µM rhod123 hinzugegeben (Endkonzentration). Rhod123 ist ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der schnell in die Mitochondrien aufgenommen wird. Die Stärke der emittierten Fluoreszenz hängt dabei von der Energieproduktion der Mitochondrien ab (zusammengefasst durch Hickey *et al.* 2005). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mittels eines LSM 780 Mikroskops durchgeführt (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge von 514 nm und einer Emissionswellenlänge von 504 bis 750 nm. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Pixelintensität in jeweils 5 gleichgroßen Regionen in 8 Bildern mit der Software ImageJ (Schneider *et al.* 2012). Die Signifikanz wurde mittels Student's t Test kalkuliert. Die Generierung von Maximumintensitätsprojektionen wurde mithilfe der Zeiss Software Zen 2009 durchgeführt. Die Lokalisierung der GABA-Transaminasen erfolgte nach Induktion des jeweiligen Stammes in einem Minimalmedium mit 20 mM GABA für 12 Stunden. Die Fluoreszenzaufnahmen des jeweiligen Stammes erfolgten mittels des

LSM 780 Mikroskops mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 500-568 nm (GFP-Filterset).

3. Ergebnisse

Der Rachisknoten ist eine unüberwindbare Barriere für trichothecendefiziente Stämme (Proctor *et al.* 1995, Maier *et al.* 2006). Diesem Gewebeabschnitt kommt daher eine Schlüsselrolle für den Aufbau einer Typ II Resistenz nach den Kriterien von Mesterhazy zu (Mesterhazy 1995). Mikroskopische Untersuchungen des Rachisknotens bei Infektion mit einem trichothecendefizienten Stamm ($\Delta tr5$) legen den Schluss nahe, dass Zellwandveränderungen zum Stopp der Infektion führen (Jansen *et al.* 2005). Die metabolischen Veränderungen im primären und sekundären Metabolismus im Rachisknoten während der Infektion sind bisher unbekannt. Um das metabolische Profil des Rachisknotens während der *F. graminearum*-Infektion abzubilden, wurde das suszeptible Weizenkultivar *Nandu* mit dem *F. graminearum*-Wildtyp sowie einem $\Delta tr5$ -Stamm infiziert und die Rachisknoten der inokulierten Blüten herauspräpariert. Die Rachisknoten wurden einer metabolischen Analyse mittels GC- und LC/MS zugeführt.

Es wurden zwei Arbeitshypothesen formuliert: 1. Es treten Veränderungen in den metabolischen Profilen der Ähren auf, die einerseits mit dem Wildtypen und andererseits mit der $\Delta tr5$ -Mutante inokuliert. 2. Die detektierten Metaboliten im $\Delta tr5$ -Stamm lassen sich RR-Metaboliten (Resistance-related) zuordnen. Als Kontrolle für beide Arbeitshypothesen wurden wasserinokulierte Ähren eingesetzt.

3.1. Vergleichbarkeit der $\Delta tr5$ - mit der Wildtyp-Infektion

Um die Menge pilzlichen Materials zu bestimmen, wurde die Menge des pilzlichen β -Tubulin Gens 5 und 10 Tage nach Inokulation (days post inoculation, dpi) mittels q-PCR bestimmt (Abbildung 6). Die Menge an detektierbarem pilzlichem Material des $\Delta tr5$ -Stamms war nach 5 dpi im Vergleich zum Wildtyp sehr gering (0,032 % der detektierten Wildtyp Mengen). Die Infektion des $\Delta tr5$ -Stammes ist daher auch im initialen Verlauf langsamer als die Wildtyp-Infektion. Die Infektionen mit dem $\Delta tr5$ -Stamm führt nur zur Kolonisation der inokulierten Blüte (Proctor *et al.* 1995), daher ist nach 10 dpi eine Akkumulation von RR-Metaboliten im Rachisknoten zu erwarten. Für die $\Delta tr5$ infizierten Proben (10 dpi) wurden 4,26 % im Vergleich zu den Wildtyp infizier-

ten Proben (5 dpi) nachgewiesen (Abbildung 6. Die weitaus geringeren Mengen an detektierten β -Tubulin-Kopien deuteten auf eine äußerst schwache Kolonisierung des Rachisknoten durch den $\Delta tr5$ -Stamm auch nach 10 dpi hin. Die Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm geschieht daher in der initialen Phase langsamer als die des Wildtyps. Der stärkste Anstieg der detektierten β -Tubulin-Kopien findet von 5 dpi zu 10 dpi statt. Der anschließende Anstieg von 10 dpi zu 15 dpi ist dabei weitaus geringer. Aus diesem Grund wurde die Proben für den $\Delta tr5$ -Stamm nach 10 dpi entnommen.

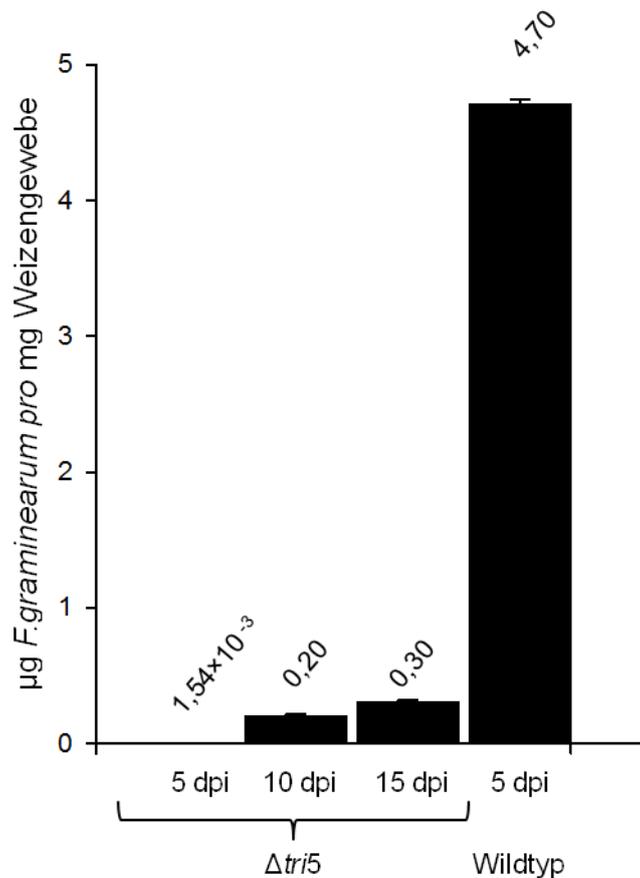


Abbildung 6 Detektierte pilzliche β -Tubulin-Mengen im Rachisknoten. Verglichen wurde die Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm nach 5, 10 15 dpi mit der Wildtyp-Infektion nach 5 dpi. Für die weitere Analyse wurden die Rachisknoten für den $\Delta tr5$ -Stamm nach 10 dpi isoliert.

Das metabolische Profil des Wildtyps wurde initial 5 dpi mittels GC/MS untersucht (im Folgenden als 1. Durchgang bezeichnet). Für den Vergleich zwischen Wildtyp und $\Delta tr5$ -Stamm wurde ein komplettes Profil mittels LC-GC/MS untersucht (2. Durchgang). Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die jeweiligen Veränderungen auf die mittels LC-GC/MS detektierten Metabolite.

Für die Analyse des metabolischen Profils des Wildtyps mittels GC/MS wurden ca. 150 Rachisknoten getrennt isoliert und in 16 biologischen Wiederholungen für die Infektion mit dem Wildtyp-Stamm sowie 8 biologischen Untersuchungen für die Wasser inokulierten Kontrollproben miteinander verglichen. Die Konzentration jedes Metaboliten wurde in Relation gesetzt zur Konzentration in der Wasserkontrolle. Für den zweiten Durchgang wurde fünf, respektive 10 dpi nach Infektion der Blüten die Rachisknoten präpariert und jeweils 6 biologische Replikate bestehend aus jeweils ca. 10 Rachisknoten untersucht.

3.2. Hauptkomponentenanalyse sowie statistische Auswertung der gefundenen Metabolite

Insgesamt wurden im ersten Durchgang 178 Metabolite detektiert. Die gefundenen Metabolite wurden zuerst mittels einer Hauptkomponentenanalyse (Principle-Component-Analysis; PCA) klassifiziert (Abbildung 7). Die biologischen Replikate des jeweiligen Gewebes ließen sich anhand der differenziell regulierten Metabolite in klar trennbare Gruppen einteilen. Alle sechs biologischen Wiederholungen des jeweiligen Gewebes wurden auf signifikante Veränderungen mittels Student's t Test überprüft. Von 178 detektierten Metabolite waren 105 signifikant ($p < 0,001$) verändert.

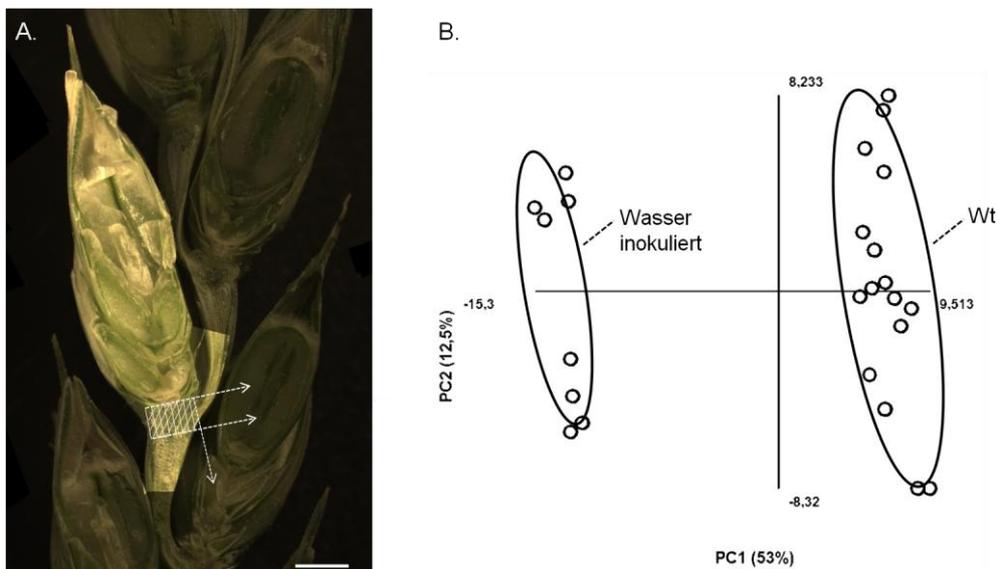


Abbildung 7 Isolation des Rachisknotens sowie Hauptkomponentenanalyse der detektierten Metabolite mittels GC/MS. **A.** Die Rachisknoten (schraffierter Bereich) von Wildtyp und Wasser inokulierten Weizenähren wurden 5 Tage nach Inokulation isoliert. In der Abbildung ist ein longitudinaler Schnitt der Blüte gezeigt. Es wurden ca. 150 Rachisknoten für die Gaschromatografische Analyse isoliert. Längenmaßstab: 5 mm **B.** Hauptkomponentenanalyse der detektierten Metabolite. Die Infektion mit dem Wildtyp-Stamm (Wt) führt zu Änderungen im Metabolom. Die Wasser inokulierten Kon-

trollproben (links) sind klar abgrenzbar von den Wildtypinfizierten Proben (rechts). Der Großteil der beobachteten Veränderungen ist zurückzuführen auf die Infektion (Vektor PC1; 53 %) und nicht die natürliche Varianz (PC2, 12,5 %). Die biologischen Wiederholungen sind im Diagramm als Kreise gezeigt (Wt: n=16, Wasser: n=8).

Mittels LC-GC/MS konnten insgesamt 6.639 Metabolite detektiert werden. Von diesen konnten 864 Metabolite annotiert werden, der Anteil der bekannten Metabolite beträgt somit 13 %. Der Großteil der gebildeten Verbindungen ist damit unbekannt und nicht näher klassifizierbar. Signifikante Änderungen ergaben sich in den mit dem Wildtyp infizierten Proben bei 678 Metaboliten im Kontrast zu 380 signifikanten Änderungen bei Infektion mit dem $\Delta tri5$ -Stamm (jeweils im Vergleich mit der jeweiligen Wasserkontrolle).

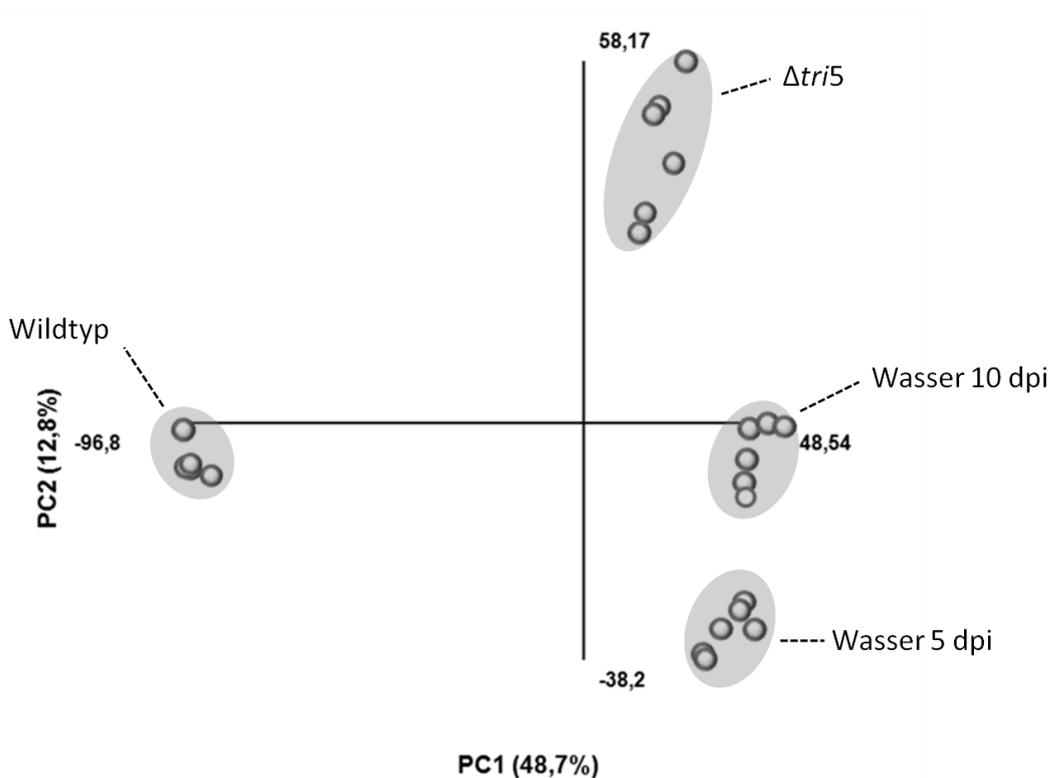


Abbildung 8 B. Hauptkomponentenanalyse mittels LC-GC/MS detektierten Metaboliten. Die stärksten Unterschiede sind beim Vergleich des Wildtyps zu jeder anderen Infektion zu finden (Vektor PC1). Die Infektion mit beiden Stämmen führt zu klar abgrenzbaren Veränderungen im metabolischen Profil. Die biologischen Wiederholungen sind im Diagramm als Punkte gezeigt (für jeden Stamm und jede Kontrolle wurden 6 biologische Replikate eingesetzt)

Die stärksten Unterschiede ergaben sich nach Infektion des Rachisknoten mit dem *F. graminearum*-Wildtyp.

3.3. Charakteristische Metabolite einer *Fusarium graminearum*-Infektion

Zwischen den gemessenen Konzentrationen der Metabolite nach Infektion und den Konzentrationen in den wasserinokulierten Kontrollproben wurde ein Verhältniswert gebildet. Dieser Verhältniswert wurde für die weitere Auswertung herangezogen. Alle Mengenangaben in Klammern hinter einem Metaboliten beziehen sich also auf einen Vergleich zur Wasserkontrolle. Die Infektion mit dem Wildtyp-Stamm führt zur Detektion des pilzlichen Membranlipids Ergosterol ($7,33 \times 10^1$). Ergosterol als Sterol-Lipid kommt nicht in der Plasmamembran von Pflanzen vor und gehört, wie Chitin, zu den sogenannten PAMPS (Pathogen-associated molecular patterns) (Chisholm *et al.* 2006). Diese PAMP-Metabolite sind daher ein Indikator für den Befall mit einem phytopathogenen Organismus. Als Synthese- oder Intermediatprodukte des pilzlichen Zellwandbestandteils Chitin wurde in den Wildtyp-infizierten Proben Chitobiose detektiert. ($4,97 \times 10^5$). Beide erwähnten Metabolite sind nicht in dem $\Delta tr15$ -infizierten Gewebe detektiert worden.

3.4. Stressperzeption und Signalmetabolite der Pflanzenverteidigung

Für die *F. graminearum*-Infektion ist die Bildung von Polyaminen als pflanzenspezifische Antwort beschrieben worden (Gardiner *et al.* 2011). Detektiert als Stressmetabolite wurden Putrescin, Agmatin, GABA und Spermidinsäure (N-Carboxyethyl-Gamma-Aminobuttersäure, CEGABA). Putrescin und CEGABA sind signifikant erhöht bei der Wildtyp-Infektion ($3,97$ sowie $9,09 \times 10^5$), jedoch nicht während der *Tr15*-Infektion. Agmatin hingegen ist sowohl bei Infektion mit dem Wildtyp ($1,75 \times 10^1$) als auch bei der $\Delta tr15$ -Infektion erhöht ($4,46 \times 10^5$). GABA ist ebenfalls im Wildtyp infizierten Gewebe ($2,65$) und weitaus schwächer bei der $\Delta tr15$ -Infektion reguliert ($1,19$). Zusammengenommen steigt nur die Agmatin-Konzentration stark an während der Infektion mit dem $\Delta tr15$ -Stamm. Polyamin-Konjugate wie Caffeoylputrescin neben Derivaten sind sowohl bei Infektion mit dem Wildtyp ($2,48 \times 10^2$) als auch bei Infektion mit dem $\Delta tr15$ -Stamm erhöht ($5,72 \times 10^1$). Mit der Ausnahme von Agmatin ist das Level an pflanzlichen Stressmetaboliten weitaus geringer während der $\Delta tr15$ -Infektion. Eine starke pflanzenspezifische Stressantwort findet daher nur in den Wildtyp infizierten Rachisknoten statt. Da charakteristische PAMP-Metabolite wie Ergosterol während der $\Delta tr15$ -Infektion nicht detektierbar sind, könnte die verminderte Synthese von

Polyaminen damit im Zusammenhang stehen. Zeitgleich mit dem Anstieg der Stressmetabolite beginnt die Akkumulation von Signalmetaboliten der Pflanzenverteidigung.

Ein wichtiges Element in der Signaltransduktion gegen phytopathogene Pilze sind in vielen Pflanzen pentazyklische Oxylipine. Zu diesen zählt u. a. Methyl-Jasmonat, das ein tragender Bestandteil der Pflanzenverteidigung gegen nekrotrophe Phytopathogene ist (zusammengefasst durch Blée 2002). Der Syntheseweg verläuft durch den Octadecanoidweg, wobei Linolensäure den ersten Metaboliten darstellt. Linolensäure ist erhöht während der Wildtyp-Infektion (2,37) wobei die Konzentration während der $\Delta tr5$ -Infektion auf $7,67 \times 10^{-1}$ absinkt. Der intermediäre Metabolit der Linolensäure ist 13-(S)-Hydroperoxylinolensäure (13-HPOTrE). Die Konzentration von 13-HPOTrE steigt in beiden Sets signifikant an (Wildtyp: $2,32 \times 10^3$, $\Delta tr5$: $2,86 \times 10^2$). Im Anschluss sinkt die Konzentration von Dihydrojasmonsäure während der Wildtyp-Infektion auf $6,95 \times 10^{-1}$ ab, wohingegen die Konzentration während der $\Delta tr5$ -Infektion auf 1,61 ansteigt. Während der Infektion mit dem $\Delta tri5$ -Stamm werden daher vermutlich vermehrt durch den Octadecanoid-Syntheseweg ausgehend von Linolensäure aktive Jasmonat-Verbindungen gebildet. Während der Infektion des Wildtyp-Stammes kommt es zu einem gegenteiligen Konzentrationsanstieg von Ursolsäure (Wildtyp: $1,48 \times 10^6$, $\Delta tr5$: unverändert). Ursolsäure wird in Pflanzen als Inhibitor von Lipooxygenasen sowie Cylooxygenasen, und in der Folge der Jasmonsäure vermittelten Pflanzenantwort diskutiert (Wasternack *et al.* 1993). Neben den Veränderungen in den Metaboliten des Octadecanoid-Stoffwechsels kommt es während der Wildtyp-Infektion es zu einem Absinken des Riboflavin-Metabolismus. Charakteristische Metabolite sind Ribitol als Polyol-Verbindung ($2,46 \times 10^{-2}$) sowie Riboflavin ($6,40 \times 10^{-2}$). Gegenläufige Bewegungen finden während der $\Delta tr5$ -Infektion statt (Ribitol: 1,62, Riboflavin: 1,17). Riboflavin ist als ein Induktor der systemischen Resistenz in *A. thaliana* beschrieben worden (Dong und Beer 2000). Der Anstieg im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe könnte daher in Verbindung mit einer erhöhten Pflanzenverteidigung stehen. In *Ashbya gossypii* kann die Riboflavin-Produktion durch die Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert werden, was den Schluss nahelegt, dass Riboflavin auch ein antioxidativ wirkender Metabolit ist (Walter und Wendland 2012).

3.5. Die Infektion mit dem Wildtyp-Stamm führt zu einem Anstieg der Zuckeralkohole

Die Zuckeralkohol (Polyol)-Konzentration wird stark durch die Wildtyp-Infektion verändert (Abbildung 9). Eine Reihe von Polyolen wird nur während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm vermehrt detektiert. Beispiele dafür sind Threitol (Wildtyp $2,55 \times 10^1$, $\Delta tr5$ unverändert), Glycerol ($4,82 \times 10^3$, $\Delta tr5$ unverändert) und Sorbitol (Wildtyp $1,20$, $\Delta tr5$ $7,86 \times 10^{-1}$). Mannitol wird vermehrt während der Wildtyp-Infektion gebildet ($9,97 \times 10^1$), während die Konzentration während der $\Delta tr5$ -Infektion nur moderat erhöht ist ($1,99$). Arabitol wird in beiden Sets vermehrt detektiert (Wildtyp: $5,05 \times 10^2$, $\Delta tr5$ $8,58$). Polyole werden häufig im Zuge der Osmoregulation bei Salzstress in Pflanzen beschrieben (Ashraf und Harris 2004). Der Anstieg während der Wildtyp-Infektion könnte daher ein Indiz für osmotischen Stress sein. Manche Metabolite, wie zum Beispiel, Mannitol akkumulieren stark im Wildtyp-infizierten Gewebe. Es wäre daher möglich, dass es sich bei Mannitol um ein Polyol handelt, welches von *F. graminearum* gebildet wird. Mannitol wird neben seiner Rolle in der Osmoregulation auch als ROS-Quenching Metabolit diskutiert (Solomon 2007). Die Konzentration von Galactinol als Substrat für die ROS induzierbare Raffinose-Synthase (Nishizawa *et al.* 2008) fällt im Wildtyp-infizierten Gewebe auf $4,90 \times 10^{-1}$ ab, während sie bei der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm auf $1,48$ ansteigt. Die Veränderung beider Polyole kann auf eine Einwirkung von ROS während der Infektion hindeuten.

3.6. Die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies ist gestört während der Wildtyp-Infektion

Reaktive Sauerstoffspezies erfüllen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen und sind darüber hinaus an intrazellulären Signalprozessen beteiligt (zusammengefasst durch Heller und Tudzynski 2011). Während der Wildtyp-Infektion kommt es zur Akkumulation von charakteristischen Metaboliten für oxidative Stressschäden im infizierten Gewebe. Als ein Indikator für die Oxidation von Nukleinsäuren kann die Bildung von Hydroxymethyluracil angesehen werden (Zastawny *et al.* 1998). Während der Wildtyp-Infektion steigt die Konzentration sehr stark auf $7,78 \times 10^5$ an, wohingegen keine Konzentrationsänderung im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe festgestellt wurde. Eine identische Reaktion wurde bei 16-Hydroperoxy-9Z,12,14E-

Octadecatrienoinsäure als Metabolit der Lipidperoxidation (Anstieg auf 8,07 im Wildtyp, $\Delta tr5$: 1,54) beobachtet.

Während die Konzentrationen an oxidierten Metaboliten im Wildtyp stark ansteigen, kommt es zeitgleich zu einem Abfall der antioxidativ wirkenden Metabolite. Die Konzentration an α -Tocopherol ist mit $7,52 \times 10^{-1}$ im Wildtyp erniedrigt, während sie bei der $\Delta tr5$ -Infektion auf 1,25 ansteigt. Ein weiterer stark antioxidativ wirkender Metabolit ist Liponsäure (Packer *et. al* 1995). Die Konzentration der Liponsäure sinkt während der Wildtyp-Infektion stark ab ($1,32 \times 10^{-3}$). Im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe findet keine signifikante Änderung statt. Die Konzentration an Dehydroascorbat fällt während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm auf $7,56 \times 10^{-1}$ ab, während sie bei der $\Delta tr5$ -Infektion nicht signifikant verändert ist (1,10). Die Menge an Dehydroascorbat ist ein Indiz für die Regeneration von Ascorbat durch den Glutathion-Ascorbat-Zyklus. Glutathion ist ein charakteristischer Metabolit für oxidative Stressschäden und wird bei der Infektion mit beiden Stämmen vermehrt gebildet. Der Anstieg fällt während der Wildtyp-Infektion mit 1,54 schwächer aus als bei der $\Delta tr5$ -Infektion mit 2,04. Im Gegensatz dazu ist die Menge an oxidiertem Glutathion im Wildtyp Set mit 2,02 stärker erhöht als während der $\Delta tr5$ -Infektion (1,58). Zusammengenommen ergibt sich daher das Bild einer stärkeren Einwirkung von ROS während der Wildtyp-Infektion. Dies resultiert in der Akkumulation von oxidierten Metaboliten, zeitgleich mit einem Abfall der ROS-detoxifizierenden Metabolite. Während der $\Delta tr5$ -Infektion kommt es nicht im gleichen Maße zu oxidativen Stressschäden, wobei die Konzentration der ROS-detoxifizierenden Metabolite ansteigt. Reaktive Sauerstoff-Spezies sind während der Wirts-Pathogen-Interaktion nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Pflanzenverteidigung, sondern darüber hinaus an der Quervernetzung von Molekülen der Zellwand beteiligt (Torres *et al.* 2006).

3.7. Metaboliten der Zellwand akkumulieren sowohl während der Wildtyp-Infektion als auch während der $\Delta trf5$ -Infektion

Die Zellwand des Rachisknotens ist während der Infektion des *Trf5*-Stammes strukturell verstärkt (Jansen *et al.* 2005). Modifikationen der sekundären Zellwand werden häufig diskutiert als Effekt einer vermehrten Lignin-Synthese (zusammengefasst durch Hückelhoven 2007). Die Ausgangsbestandteile der Lignine werden durch den Phenylpropanoid-Stoffwechsel synthetisiert. Veränderungen im Phenylpropanoid-Stoffwechsel könnten daher im Zusammenhang mit einer erfolgreichen Pflanzenverteidigung stehen.

Zentrale Metabolite des Phenylpropanoid-Stoffwechsels sind im Zuge der Infektion in den Wildtyp und $\Delta trf5$ infizierten Rachisknoten erhöht. Der putative RR-Metabolit p-Coumarinsäure steigt bei Infektion mit beiden Stämmen an (Wildtyp: 2,18; $\Delta trf5$: 1,23). Für eine Aktivierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels spricht auch die Akkumulation von Phenylpropiolinsäure, die gleichermaßen sowohl im Wildtyp ($1,93 \times 10^6$) als auch während der $\Delta trf5$ -Infektion ($1,11 \times 10^6$) stark akkumuliert. Coumarin wird ebenfalls vermehrt gebildet im Zuge der Infektion beider Stämme (Wildtyp: $7,41 \times 10^6$, $\Delta trf5$: $2,95 \times 10^6$). Zusätzlich wurde α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure detektiert. In diesem Fall kommt es nur zu einem signifikanten Anstieg während der Wildtyp-Infektion ($1,85 \times 10^6$). Die Konzentration an Ferulasäure fällt während der Wildtyp-Infektion ($5,92 \times 10^{-1}$) ab, wohingegen die Konzentration während der $\Delta trf5$ -Infektion mit $9,36 \times 10^{-1}$ nicht signifikant verändert ist. Ein Derivat der Ferulasäure steigt hingegen während der Wildtyp-Infektion stark an ($4,89 \times 10^5$), während die Konzentration bei der $\Delta trf5$ -Infektion nicht signifikant reguliert wird. Während der Infektion des $\Delta trf5$ -Stammes kommt es zu einer signifikanten Akkumulation der pflanzlichen Lignan-Verbindung Deoxypodophyllotoxin (Wildtyp: 1,93, $\Delta trf5$: 3,74). Lignane sind natürliche Pflanzenverbindung, welche häufig zytotoxische Eigenschaften aufweisen (Canel *et al.* 2000) und aus den Vorläufern der Lignin-Verbindungen synthetisiert werden. Zusammengefasst kommt es bei der Infektion beider Stämme zu einer Aktivierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels. Der Anstieg der involvierten Verbindungen fällt während der Wildtyp-Infektion stärker aus.

Ausgehend vom Phenylpropanoid-Stoffwechsel kommt es während der Wildtyp-Infektion zu Veränderungen von einem Intermediat des Syringyl-Lignin. Die Konzentration von Sinapylalkohol sinkt während der Wildtyp-Infektion auf $2,34 \times 10^{-1}$ ab, wäh-

rend sie bei der $\Delta tr5$ -Infektion nicht signifikant reguliert wird ($6,83 \times 10^{-1}$). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Synthese von Lignin-Verbindungen während der kompatiblen Reaktion (Wildtyp) gestört ist.

Neben Lignin ist Cellulose das Hauptpolymer in der sekundären Pflanzenzellwand. Ein Metabolit, das als Indikator sowohl für den Aufbau als auch den Abbau der Cellulose dienen könnte, ist Cellobiose. Cellobiose entsteht als Abbaumetabolit durch die Spaltung von Cellulose durch Cellulasen. In seiner Rolle im Aufbauprozess wird Cellobiose umgesetzt zu Glukose-1-Phosphat. Anschließend wird GDP-Glukose gebildet, welches der direkte Vorläufer der Cellulose ist. Während der Wildtyp-Infektion fällt die Konzentration auf $3,84 \times 10^{-2}$ ab, während sie bei der $\Delta tr5$ -Infektion nicht signifikant reguliert wird ($9,73 \times 10^{-1}$).

Ein weiterer Metabolit, der als Indikator für Veränderungen in der Zellwand-Synthese herangezogen werden kann, ist Xylose als Degradationsmetabolit der xylanhaltigen Hemicellulosen. Die Untereinheiten der Xylane bestehen aus D-Xylose, welches während der Infektion beider Stämme ansteigt (Wildtyp: 2,00, $\Delta tr5$: 2,48). Es kommt daher bei der Wildtyp-Infektion höchstwahrscheinlich zu Veränderungen in der Lignin- sowie Cellulose-Zusammensetzung der sekundären Zellwand sowie zu einem vermehrten Abbau der xylanhaltigen Hemicellulosen bei der Infektion mit beiden Stämmen.

Neben den Metaboliten mit direkten Bezug zur Virulenz (Zellwand, ROS, Signaltransduktion) finden bei der Infektion tiefgreifende Umgestaltungen des Primärmetabolismus statt (Abbildung 9, Abbildung 10). Diese Umgestaltungen gehen einher mit einem Absinken der Zucker- und Aminosäure-Konzentrationen.

Ergebnisse

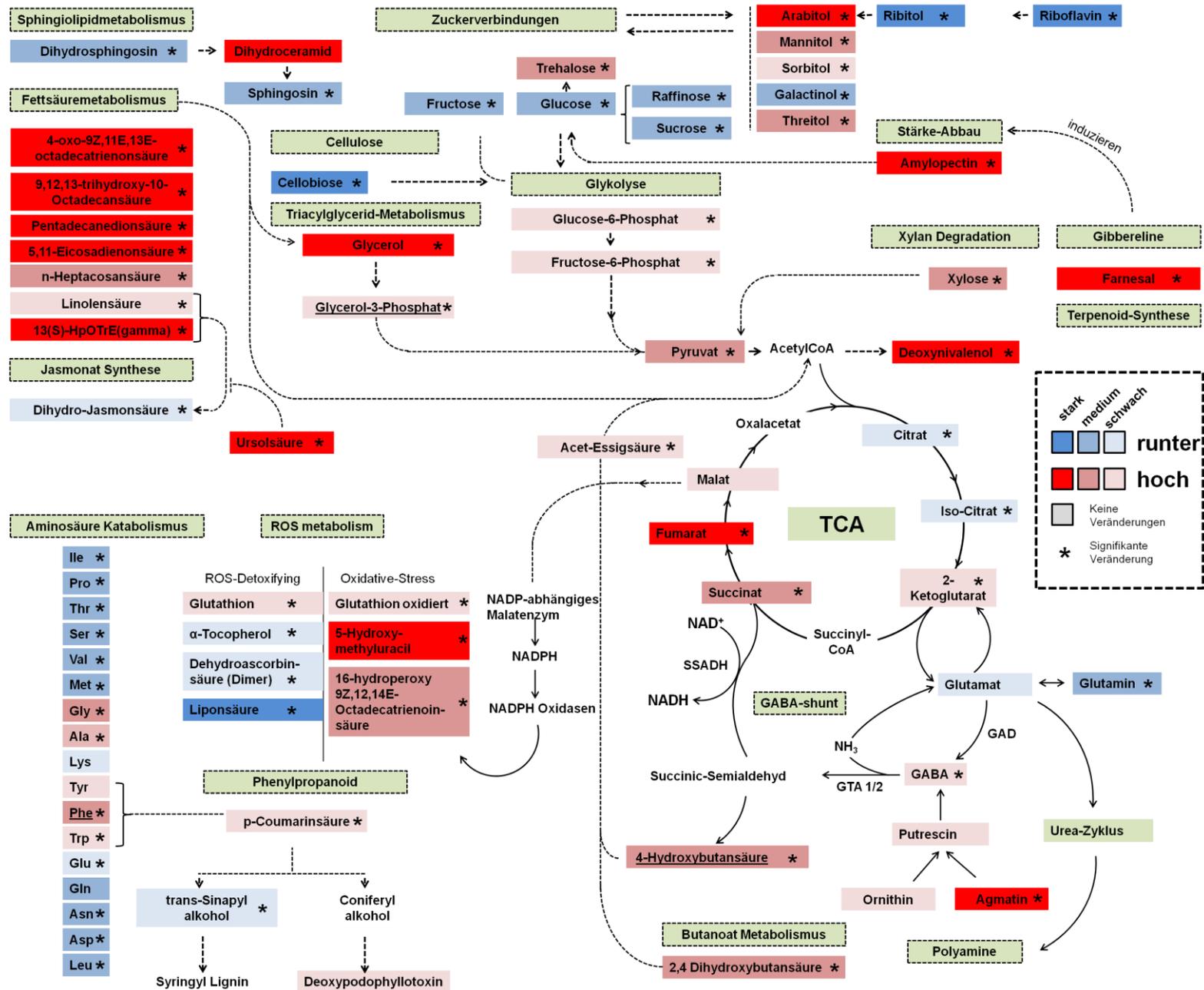


Abbildung 9 Veränderungen im metabolischen Profil während der Wildtyp-Infektion. Signifikant veränderte Metaboliten wurden mit einem Stern versehen. (Student's t-Test, p < 0,05).

Ergebnisse

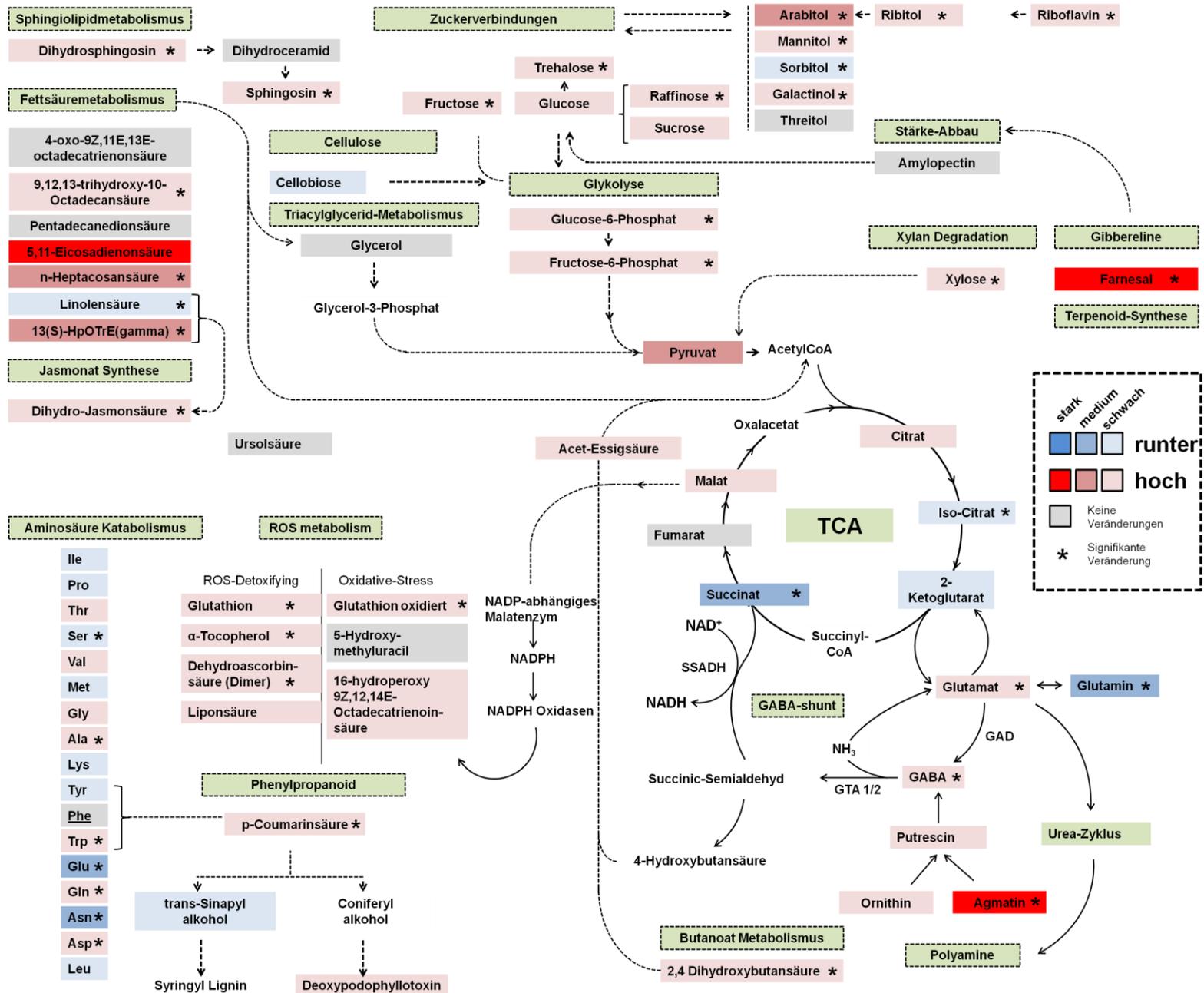


Abbildung 10 Veränderungen im metabolischen Profil während der $\Delta tri5$ -Infektion. Signifikant veränderte Metaboliten wurden mit einem Stern versehen (Student's T-Test $p < 0,05$)

3.8. Während der Wildtyp-Infektion kommt es zu einem Konzentrationsabfall der Aminosäuren

Als globale metabolische Stickstoffmarker wurden die Konzentrationen der freien Aminosäuren herangezogen. Insgesamt wurden 19 Aminosäuren detektiert, von denen alle signifikant reguliert werden während der Wildtyp-Infektion. Von diesen sinken bei 14 die gemessene Konzentration ab. Ein Anstieg wurde bei Glycin, Cystein, Alanin, Threonin und Tryptophan gemessen. Während die Konzentration eines Großteils der Aminosäuren im Verlauf der Wildtyp-Infektion absinkt, werden bei der $\Delta trf5$ -Infektion nur 11 signifikant reguliert. Von den 11 signifikant regulierten Aminosäuren während der Infektion mit dem $\Delta trf5$ -Stamm fällt nur bei vier Aminosäuren die Konzentration ab, bei sieben steigt das Level an. Zusätzlich zu den Aminosäuren, die im Wildtyp erhöht vorliegen, steigt die Konzentration von Glutamat, Allantonin und Aspartat an. Die Infektion mit dem Wildtyp führt daher wahrscheinlich zu einem Stickstoffmangel, im Gegensatz zu der $\Delta trf5$ -Infektion. Das Absinken der Aminosäure-Konzentrationen ist wahrscheinlich auf Katabolismus-Prozesse zurückzuführen. Anzeichen dafür zeigen sich in der Regulation des Lysin- sowie Glutamat- Stoffwechsels.

Von den Metaboliten des Lysin-Metabolismus finden sich hohe Konzentrationen des Degradationsmetaboliten α -Amino adipat bei der Infektion mit beiden Stämmen im Gewebe (Wildtyp: $7,43 \times 10^6$, $\Delta trf5$: $1,16 \times 10^6$). Dieser Metabolit deutet auf einen vermehrten Abbau von Lysin hin. Ebenso kommt es zu einem Anstieg von Dihydropicolinsäure – als charakteristischer Metabolit für eine vermehrte Lysin-Synthese (Wildtyp: $1,86 \times 10^6$, $\Delta trf5$: $1,07 \times 10^6$). Die Konzentration von Homo-Iso-Citrat als Intermediärmetabolit der pilzlichen Lysin-Synthese ist bei der Infektion mit beiden Stämmen nicht signifikant verändert (Wildtyp: 1,01, $\Delta trf5$: 1,09). Es findet daher ein verstärkter Abbau von Lysin von pflanzlicher Seite aus statt, der von einer vermehrten Neusynthese begleitet wird.

Indizien für vermehrte Katabolismus-Prozesse der Aminosäuren sind ebenfalls in Metaboliten des Urea-Zyklus zu finden. Die Zuführung von Glutamat in den Urea-Zyklus ist zum Beispiel während der Wildtyp-Infektion stark erhöht, was sich durch eine erhöhte Konzentration von N-Acetyl-L-Glutaminsäure ($2,57 \times 10^6$) sowie N-Acetyl-L-Glutamat 5-Semialdehyd ($2,00 \times 10^6$) zeigt. Die Konzentration der Degradationsmetaboliten des Tryptophan steigt bei der Infektion mit beiden Stämmen an. Als

Beispiel kann die Bildung von Kynurenin herangezogen werden (Wildtyp: $3,47 \times 10^6$, $\Delta tr5$: $8,06 \times 10^5$). Obwohl die Bildung von Degradationsmetaboliten auf einen vermehrten Abbau des Tryptophans hindeutet, wurde im Wildtyp infizierten Gewebe ein Tryptophan-Anstieg festgestellt. Die vermehrten katabolischen Prozesse müssen daher in Verbindung mit einer stärkeren Neubildung (analog zur Lysin-Synthese) ausgehend vom Anthranilat (nicht detektiert) stehen. Nur während der Infektion des Wildtyps kommt es zu einem Anstieg von 2-Aminomuconat-6-Semialdehyd ($1,20 \times 10^7$). Dieser Metabolit kann als Indiz angesehen werden, dass keine Neusynthesen ausgehend vom Kynurenin stattfinden, sondern der Abbau von Tryptophan bis zur Acetyl-CoA-Bildung stattfindet. Dies würde für einen Katabolismus der Aminosäuren sprechen, der den Bedarf an Substraten für die Glykolyse deckt (vgl. Abfall der Zuckerverbindungen sowie Metabolisierung der Stärke).

3.9. Metabolisierung von Speicherstoffen und Kohlenhydraten im Zuge der Infektion

Ausgehend vom Sesquiterpen-Stoffwechsel wird in *F. graminearum* das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) gebildet. Während der Infektion mit beiden Stämmen ist die Konzentration von Farnesal als Metabolit der Sesquiterpen-Synthese stark erhöht (Wildtyp: $1,78 \times 10^6$; $\Delta tr5$: $1,22 \times 10^6$). Aufgrund der fehlenden pilzlichen Marker-Metabolite im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe (s.o.), erscheint eine Bildung von Farnesal von Pflanzenseite plausibel. DON als Endprodukt der Terpenoid-Synthese wird nur im Wildtyp-Stamm gebildet ($5,24 \times 10^6$), jedoch wie erwartet nicht in der Trichodien-Deletionsmutante. Interessanterweise kommt es bei der Infektion des Wildtyp-Stammes zu einem Absinken der Konzentration von Dolichyl-Diphosphat, was als Indikator für die Synthese von N-Glucanen dienen kann (Wildtyp: $1,68 \times 10^{-1}$; $\Delta tr5$ nicht signifikant verändert). Im Gegenzug steigen die Konzentrationen der Gibberelinsäuren an, die ebenfalls aus dem Sesquiterpen-Stoffwechsel synthetisiert werden. Insgesamt wurden 12 Gibberelin-Verbindungen und ihre Derivate im metabolischen Profil detektiert. Die Konzentration aller 12 Verbindungen stieg bei Infektion mit dem Wildtyp-Stamm sehr stark und signifikant an. Bei Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm werden nur 5 Gibberelin-Verbindungen signifikant akkumuliert. Entwicklungsbiologisch wird während der Samenkeimung die Sekretion von α -Amylasen aus dem Aleuron durch Gibbereline eingeleitet (Varner *et al.* 1964). Die Freisetzung von Gib-

berellinen ist daher verbunden mit der Initiation der Samenkeimung. Amylopectin als Bestandteil der Stärke (Amylum) steigt stark an während der Wildtyp-Infektion ($1,57 \times 10^6$). Die Freisetzung von Amylopectin findet nur während der Wildtyp-Infektion statt und wird weder während der $\Delta tr5$ -Infektion, noch beim Vergleich der Wasserkontrollen reguliert. Dies deutet darauf hin, dass vermehrt Speicherstoffe des Samens zur Deckung des Energiebedarfs herangezogen werden.

Neben der Metabolisierung der Stärke fallen die Konzentrationen der freien Zuckerverbindungen wie Glukose ($5,04 \times 10^{-1}$), Fruktose ($6,94 \times 10^{-1}$), Saccharose ($6,79 \times 10^{-1}$) und Raffinose ($6,80 \times 10^{-1}$) im Zuge der Wildtyp-Infektion signifikant ab. Entgegengesetzt hierzu bleiben die Konzentrationen dieser Zucker nahezu konstant während der $\Delta tr5$ -Infektion. Die Raffinose-Konzentration steigt im $\Delta tr5$ -infizierten Gewebe entgegengesetzt zur Wildtyp-Infektion auf 2,84 an. Der Abfall der Zuckerverbindungen sowie die Metabolisierung der Stärke treten daher nur während der Wildtyp-Infektion auf. Beide Veränderungen deuten daraufhin, dass ein vermehrter Energiebedarf während der Infektion besteht. Eine Zucker-Verbindung, die möglicherweise von *F. graminearum* während der Infektion synthetisiert wird, ist D-alpha,alpha'-Trehalose. Die Konzentration steigt im Wildtyp infizierten Gewebe auf $1,35 \times 10^1$ an, während sie im Vergleich bei der $\Delta tr5$ -Infektion nur auf 1,31 ansteigt. Trehalose wird häufig als pilzlicher Zucker beschrieben, kann allerdings unter Salz und Trockenstress-Bedingungen auch von *T. aestivum* synthetisiert werden (Gancedo und Carmen-Lisset 2006, El-Bashiti *et al.* 2005).

Neben den Zuckerverbindungen, sind bei der Infektion beider Stämme tiefgreifende Veränderungen im Glycerolipidmetabolismus auszumachen. Von 39 gefunden Fettsäuren steigen 34 teilweise sehr stark an während der Wildtyp-Infektion. Während der $\Delta tr5$ -Infektion sind 22 Fettsäuren schwach erhöht. Ausgehend vom Triacylglycerid-Metabolismus kommt es zu einem Anstieg von Glycerol (Wildtyp: $4,82 \times 10^3$, $\Delta tr5$ unverändert), Glycerol-3-Phosphat (2,36 GC/MS, nicht detektiert während der $\Delta tr5$ -Infektion). Dies legt den Schluss nahe, dass ein vermehrter Katabolismus der Fette und Lipide während der Wildtyp-Infektion stattfindet. Die Degradation der Fettsäuren mündet dabei in der Freisetzung von Acetyl-CoA.

Bei den Spingolipiden der Zellmembran zeigt sich ein Abfall im Wildtyp infizierten Gewebe von Sphingosin ($6,70 \times 10^{-1}$), sowie Dihydrosphingosin ($3,09 \times 10^{-1}$). Die Konzentrationen von Sphinganin-1-Phosphat ($7,97 \times 10^5$), Dihydroceramid ($3,52 \times 10^6$) sowie 3-Ketosphingosin (2,51) nehmen stark zu. Während der $\Delta tr5$ -Infektion kommt es

ebenfalls zu einem starken Anstieg von 3-Ketosphingosin. Alle anderen Metabolite, wie z. B. Sphinganin-1-Phosphat oder Dihydroceramid sind entweder unverändert oder nur moderat verändert (Anstieg von Dihydrosphingosin: 1,31). Die Umgestaltung des Sphingolipid-Metabolismus tritt dabei, analog zu den Veränderungen im Glycerolipidmetabolismus, nur bei der Wildtyp-Infektion auf. Als Indikator für vermehrte Katabolismus-Prozesse der Glycerophospholipide könnte der Anstieg von Ethanolamin dienen, das im Mittel bei der Wildtyp-Infektionen stark, allerdings nicht signifikant ansteigt (Wildtyp 9,85, $\Delta trf5$ $8,92 \times 10^{-1}$). Unter den Butanoat-Verbindungen wurden stark erhöhte Konzentrationen von 2,4 Dihydroxybutansäure (Wildtyp $2,11 \times 10^1$, $\Delta trf5$: 2,71) sowie 4-Hydroxybutansäure (Wildtyp $1,93 \times 10^2$, GC/MS, nicht detektiert im $\Delta trf5$ infizierten Gewebe) gefunden. Der Abbau der Butanoate findet über Aceto-Acetat als direktem Vorläufer von Acetyl-CoA statt. Während der Wildtyp-Infektion kommt es zu einem stark signifikanten Anstieg von Aceto-Acetat auf 3,82, während bei der $\Delta trf5$ -Infektion keine signifikanten Änderungen festgestellt wurden. In Verbindung mit dem Anstieg der Butanoat-Verbindungen kann die Aussage getroffen werden, dass die vermehrte Mobilisierung von Butanoaten während der Wildtyp-Infektion zur Deckung des Energiebedarfs stattfindet.

Die Quellen, die dafür herangezogen werden, scheinen beim Wildtyp die Speicherstoffe wie Lipide, Butanoate sowie die freien Zuckerverbindungen zu sein. Während der $\Delta trf5$ -Infektion lassen sich diese Bewegungen nicht ausmachen. Die erhöhten Pyruvat-Mengen können daher ohne messbare Verluste aus dem Primärstoffwechsel bereitgestellt werden.

3.10. Veränderungen in den Metaboliten des TCA-Zyklus sowie des GABA-shunts

Grundsätzlich wird die Energieversorgung der Zelle durch den Tri-Carbon-Säure-Zyklus (TCA) in den Mitochondrien sichergestellt. Die Metabolite des Citrat-Zyklus und seine Intermediate sind in vielen biochemischen Kreisläufen wichtige Reaktionspartner. Indizien für einen vermehrten Flux von Metaboliten zum TCA-Zyklus finden sich im Abfall der Zucker-Verbindungen Glukose, Fruktose, Raffinose und Saccharose. In der Folge kommt es zu einem Anstieg der Metabolite der Glykolyse bei der Infektion mit beiden Stämmen. Die Konzentration von Glukose-6-Phosphat (Wildtyp: 1,2, $\Delta trf5$: 1,48), Fruktose-6-Phosphat (Wildtyp: 1,38, $\Delta trf5$: 1,47), Glycerinsäure-3-

Phosphat (1,45, 1. Durchgang, nicht detektiert im $\Delta trf5$ infizierten Gewebe) steigt bei der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm an. Die additiven Effekte der vermehrten Glykolyse sowie der vermehrten Katabolismus-Prozesse führen in der Folge zu einer vermehrten Detektion von Pyruvat (Wildtyp: $1,10 \times 10^1$, $\Delta trf5$: $5,56 \times 10^1$) (Abbildung 9, Abbildung 10). Obwohl glykolytische und lipolytische Prozesse zu einem Überangebot von Acetyl-CoA und in der Folge zu einer vermehrten Energieproduktion führen, sinken die Konzentrationen der TCA-Metabolite direkt nach der Einspeisung von Acetyl-CoA ab. Die Konzentration von Zitronensäure fällt während der Wildtyp-Infektion auf $8,67 \times 10^{-1}$ ab, während sie nicht reguliert wird im Verlauf der $\Delta trf5$ -Infektion. Die Konzentration von Iso-Citrat als nachfolgendem Metabolit sinkt während der Wildtyp-Infektion in der Folge auf $6,92 \times 10^{-1}$ ab, während der Abfall im Verlauf der $\Delta trf5$ -Infektion mit $8,12 \times 10^{-1}$ schwächer ausfällt.

Die Konzentration von 2-Ketoglutarat steigt hingegen während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm auf 4,27 an, während bei der $\Delta trf5$ -Infektion keine signifikanten Änderungen detektiert wurden. In den Metaboliten der späteren Reaktionsschritte wurden stark erhöhte Konzentrationen von Succinat im wildtypinfizierten Gewebe festgestellt ($1,70 \times 10^1$). Im $\Delta trf5$ infizierten Gewebe herrscht im Gegensatz dazu ein Succinat-Mangel ($3,26 \times 10^{-1}$). Die Konzentrationen von Fumarat steigen im wildtypinfizierten Gewebe auf $9,40 \times 10^2$ an (keine Regulierung im $\Delta trf5$ infizierten Gewebe). Abschließend steigt die Konzentration von Malat schwach während der Wildtyp-Infektion an (nicht signifikant reguliert während der $\Delta trf5$ -Infektion). Auffällig ist der sehr starke Succinat-Anstieg im wildtypinfizierten Gewebe, der nicht im gleichen Maße durch Konzentrationsanstiege der vorangegangenen Metaboliten erklärbar ist. Vermutlich findet daher eine vermehrte Zufuhr durch andere Stoffwechselwege statt. In diesem Zusammenhang ist die Bildung von 4-Aminobuttersäure (GABA) (Anstieg während der Wildtyp-Infektion auf 2,65, nicht signifikant reguliert während der $\Delta trf5$ -Infektion) von Interesse. In der Folge kommt es zur vermehrten Bildung von Succinat-Semialdehyd (Anstieg von 3,82, nicht detektiert während der $\Delta trf5$ -Infektion). Der Anstieg beider Metabolite ist ein Indiz für eine vermehrte Bereitstellung von Succinat durch den sogenannten GABA-shunt. Im GABA-shunt wird durch die Decarboxylierung von Glutamat GABA gebildet. GABA wird durch Transaminasen unter Rekonstituierung von 2-Ketoglutarat zu Succinat-Semialdehyd umgewandelt. Dieses wird anschließend durch Dehydrogenasen umgesetzt zu Succinat, welches in den TCA-

Zyklus eingebracht wird. Die erhöhte Konzentration von 2-Ketoglutarat könnte daher auf die Rolle als Amino-Akzeptor im GABA-shunt zurückzuführen sein.

Zusammengenommen kommt es bei der Infektion des Wildtyp-Stammes zu vermehrten Katabolismus-Prozessen, die in der Bereitstellung von Acetyl-CoA sowie Pyruvat münden. Trotz des stärkeren Flusses von Metaboliten hin zum TCA-Zyklus findet kein gleichbleibender Anstieg der Metabolite innerhalb des Kreislaufes statt. Der starke Anstieg von Succinat lässt den Schluss zu, dass eine vermehrte Zufuhr durch andere Stoffwechselwege stattfindet. Ein prioritär beschrittener Weg der Succinat-Bereitstellung unter Stressbedingungen ist der GABA-shunt (Bouché und Fromm 2004). In diesem Stoffwechselweg mündet der Polyamin-Abbau über Putrescin sowie über die Rekonstituierung von 2-Ketoglutarat der Stickstoffmetabolismus. Vor dem Hintergrund des Polyamin und GABA-Anstieges, dem ausgeprägten Katabolismus der Aminosäuren während der Wildtyp-Infektion sowie der aufgezeigten Rekrutierung von Energie liefernden Stoffwechselwegen ist der GABA-shunt höchstwahrscheinlich von eminenter Bedeutung für die Pathogen-Pflanze-Interaktion. Um daher die Bedeutung des GABA-Metabolismus für die Weizeninfektion nachzuvollziehen, wurde der pilzliche GABA-Metabolismus durch Deletion zweier GABA-Transaminasen ausgeschaltet.

3.11. Generierung der Deletions-Mutanten sowie der GFP-Fusionskonstrukte

Zwei putative GABA-Transaminasen wurden in der MIPS-Datenbank gefunden (FGSG_05554 und FGSG_06751, hernach als *gta-1* und *gta-2* bezeichnet). *Gta-1* weist 67 % Homologie, *gta-2* 58 % zu einer annotierten GABA-Transaminase von *M. oryzae* (NCBI XP_003714648.1) auf. Beide gefundenen Transaminasen wurden über einen homologen Rekombinationsansatz durch einen Antibiotika-Marker ersetzt. Primärmutanten wurden mittels PCR und Southern Blotting überprüft (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13).

Ergebnisse

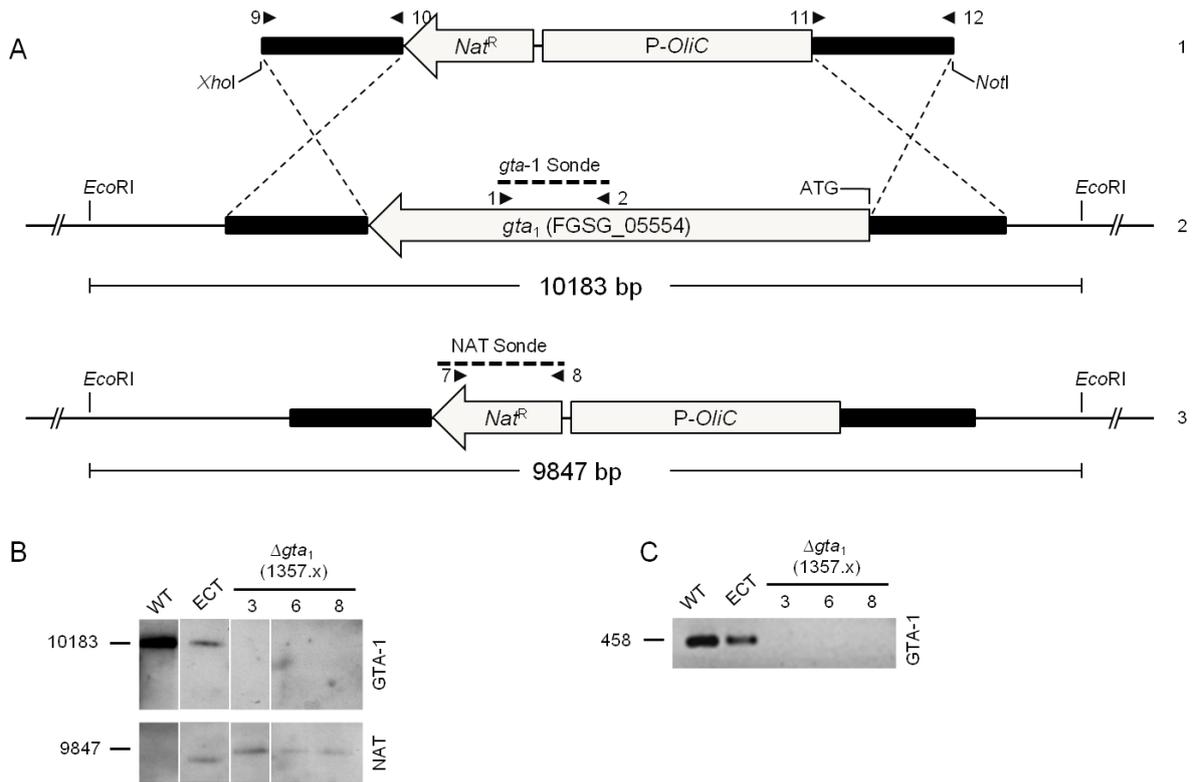


Abbildung 11 Vektor-Klonierung und Southern Strategie für die Deletion von *gta-1*. **A.** Deletion von *gta-1* (2) durch homologe Rekombination mit einem Deletionsvektor (1). Die Flanken wurden mithilfe der Primer 9 und 10 für die 5' Flanke, sowie den Primern 11 und 12 für die 3' Flanke amplifiziert. Mittels Hefe-Rekombinationsklonierung wurden die Fragmente mit der *Nat*-Resistenzkassette ligiert. Der fertige Vektor wurde mit *XhoI* und *NotI* verdaut und zur zielgerichteten Deletion von FGSG_05554 (*gta-1*.) eingesetzt (3). **B.** Erhaltene Transformanten wurden mithilfe eines Southern-Blots überprüft. Die Detektion mit der geninternen Sonde (Primerkombination 1 und 2) ergab keine Bande in den Transformanten 3; 6 und 8. Der Ektop sowie der Wildtyp zeigten eine Bande bei 10183 bp. Die Hybridisierung mit der Resistenzkassette ergab eine Bande bei 9847 bp bei den Transformanten und kleinere bei dem ektopischen Transformanten. Im Wildtyp wurde keine Bande detektiert. **C.** Die Überprüfung mittels PCR ergab eine Bande bei 458 bp im Wildtyp sowie im ektopischen Transformanten, nicht jedoch in den Transformanten 3; 6 und 8. Es wurden drei unabhängige Δgta_1 -Mutanten generiert. In den Mutanten konnte keine geninterne Bande (FGSG_05554) amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten in den Mutanten die Integration der Resistenzkassette bestätigt werden.

Die Deletion von FGSG_06751 (*gta-2*) erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren. Transformanten wurde mithilfe von PCR auf das Vorhandensein einer geninternen Bande hin überprüft (Abbildung 12)

Ergebnisse

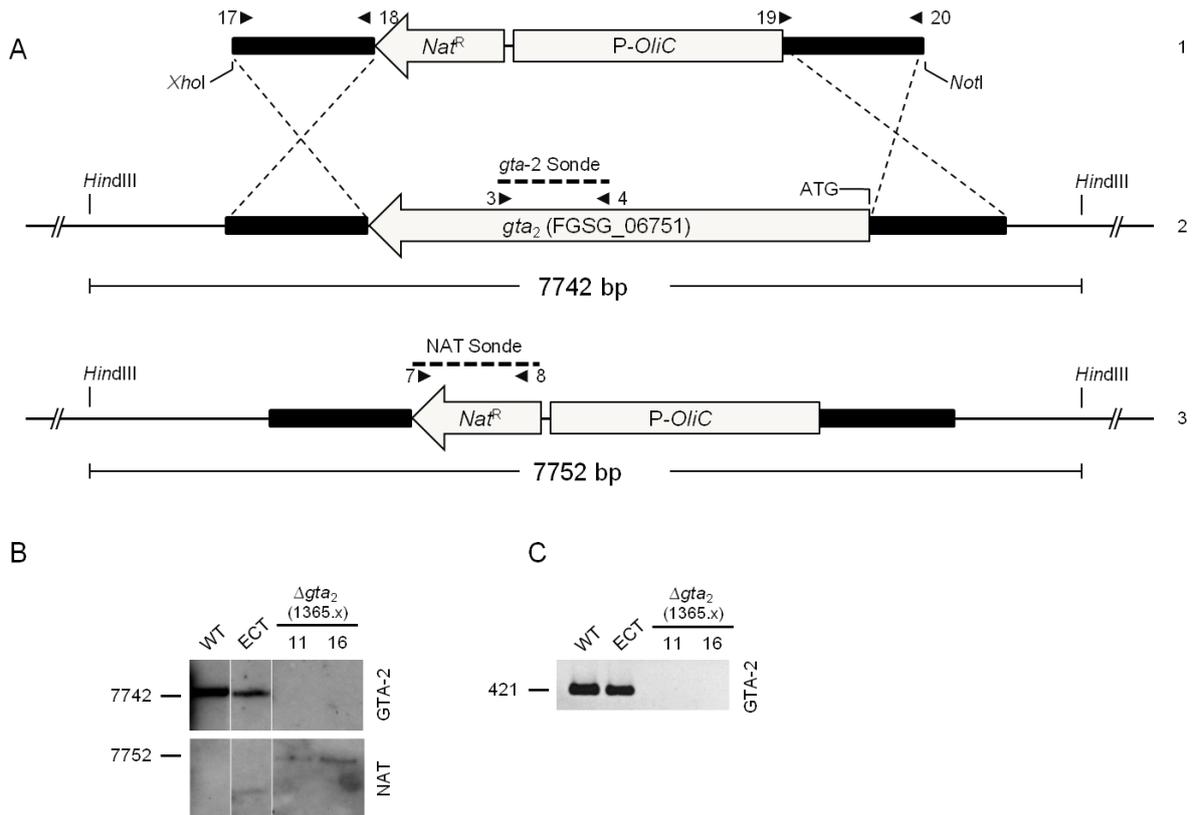


Abbildung 12 Vektor-Klonierung und Southern Strategie für die Deletion von *gta-2*. **A.** Deletion von *gta-2*. (2) durch homologe Rekombination mit einem Deletionsvektor (1). Die Flanken wurden mithilfe der Primer 13 und 14 für die 5' Flanke, sowie den Primern 15 und 16 für die 3' Flanke amplifiziert. Mittels Hefe-Rekombinationsklonierung wurden die Fragmente mit der Nat-Resistenzkassette ligiert. Der fertige Vektor wurde mit *XhoI* und *NotI* verdaut und zur zielgerichteten Deletion von FGSG_06751 eingesetzt (3). **B.** Erhaltene Transformanten wurden mithilfe eines Southern-Blots überprüft. Die Detektion mit der geninternen Sonde (Primerkombination 3 und 4) ergab kein Signal in den Transformanten 11 und 16. Der ektopische Transformant und der Wildtyp zeigten eine Bande bei 7742 bp. Die Hybridisierung mit der Resistenzkassette ergab eine Bande bei den Transformanten bei 7752 bp. Die Bande bei dem ektopischen Transformanten ist kleiner als in den Deletionsmutanten. Im Wildtyp wurde keine Bande detektiert. **C.** Die Überprüfung mittels PCR mit der Primerkombination 3 und 4 ergab eine Bande bei 458 bp im Wildtyp sowie im ektopischen Transformanten, nicht jedoch in den Transformanten 11 und 16.

Transformanten, in denen keine interne Bande nachweisbar, aber Nourseothricin als Resistenzmarker integriert war, wurden mithilfe eines Southern-Blots überprüft. Es konnten zwei Transformanten festgestellt werden, wo FGSG_06751 durch den Deletionsvektor homolog ausgetauscht war. Zur Generierung der Doppelmutanten wurde eine bestätigte Einzelmutante von *gta-1* mit einem Deletionsvektor für *gta-2* mit Hygromycin als Resistenzmarker transformiert.

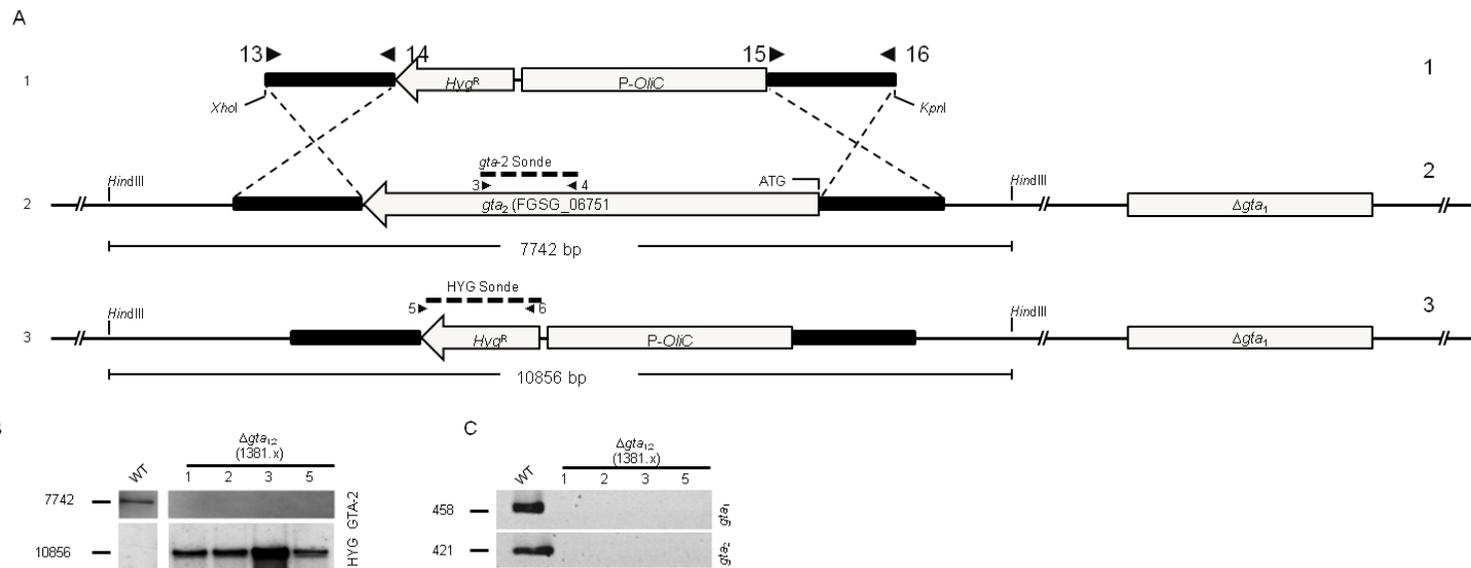


Abbildung 13 Vektor-Klonierung und Southern Strategie für die Deletion von *gta-2* im Δgta_1 Hintergrund **A.** Deletion von *gta-2* in einem Δgta_1 Stamm (2) durch homologe Rekombination mit einem Deletionsvektor (1). Die Flanken wurden mithilfe der Primer 13 und 14 für die 5' Flanke, sowie den Primern 15 und 16 für die 3' Flanke amplifiziert. Mittels Hefe-Rekombinationsklonierung mit der Hygromycin-Resistenzkassette ligiert. Der fertige Vektor wurde mit *XhoI* und *KpnI* verdaut und zur zielgerichteten Deletion von FGSG_06751 (*gta-2*) in einer bestätigten Δgta_1 -Mutante eingesetzt (3). **B.** Erhaltene Transformanten wurden mithilfe eines Southern-Blots überprüft. Die Detektion mit der geninternen Sonde (Primerkombination 3 und 4) ergab keine Bande in den Transformanten 1;2;3 und 5. Der Wildtyp zeigte eine Bande bei 7742 bp. Die Hybridisierung mit der Resistenzkassette ergab eine Bande bei 10856 bp. Im Wildtyp wurde keine Bande detektiert. **C.** Die Überprüfung mittels PCR mit der Primerkombination 1 und 2 ergab eine Bande bei 458 bp im Wildtyp für *gta-1*, nicht jedoch in den Transformanten 1;2;3 und 5. Die Überprüfung mit der Primerkombination 3 und 4 als interne Sequenz von *gta-2* ergab eine Bande von 421 bp im Wildtyp. In den Transformanten 1,2,3 und 5 konnte keine Bande amplifiziert werden.

Es wurden drei Mutanten für *gta-1* (Δgta_1), zwei Mutanten für *gta-2* (Δgta_2) sowie drei Doppelmutanten ($\Delta\Delta gta_{1;2}$) näher charakterisiert. Einer der erzeugten Doppelmutanten wurde mit dem Plasmid pII99::dsRed (Ilgen *et al.* 2009) transformiert. Dies ermöglicht die Expression des Fluoreszenzproteins DsRed im Cytosol der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten. Um die Lokalisation beider GABA-Transaminasen zu überprüfen, wurden ca. 1 kb der putativen Promotorsequenz sowie die gesamte kodierende Sequenz mit dem ORF von eGFP C-Terminal fusioniert. Beide generierten Plasmide wurden zur Transformation des Wildtyp-Stamms eingesetzt (Abbildung 5).

3.12. Beide Transaminasen sind synergistisch am GABA-, Putrescin- und Spermidin-Abbau beteiligt

Die Substratspezifität der erzeugten Deletionsmutanten wurde auf Agarplatten mit Minimalmedium (MM) mit GABA, β -Alanin und Putrescin als einzige Stickstoffquelle überprüft (Abbildung 14). Das Wachstum auf MM-NaNO₃-Platten diente als Referenzvergleich. Nach drei Tagen Wachstum auf MM-NaNO₃-Platten zeigten alle erzeugten Deletions-Mutanten einen ähnlichen Koloniedurchmesser wie der Wildtyp. Die Kultivierung auf MM-GABA als einziger Stickstoffquelle führte zu einem drastisch reduzierten Wachstum bei den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten und einem leicht reduzierten Wachstum bei den Δgta_1 -Mutanten. Der Wildtyp und die Δgta_2 -Mutanten wuchsen auf GABA vergleichbar. Wird das strukturell ähnliche β -Alanin als Stickstoffquelle eingesetzt, sind die Δgta_2 -Mutanten sowie die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten im Wachstum reduziert. Der Wildtyp sowie die Δgta_1 -Mutanten wuchsen dabei vergleichbar. Die Transaminase *gta-1* hat also eine Substratspezifität für GABA, wohingegen *gta-2* eine β -Alanin und GABA verstoffwechselt. Obwohl beide Transaminasen unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, sind beide synergistisch am GABA-Abbau beteiligt. Der β -Alanin-Metabolismus wird im Gegensatz dazu nur von *gta-2* katalysiert.

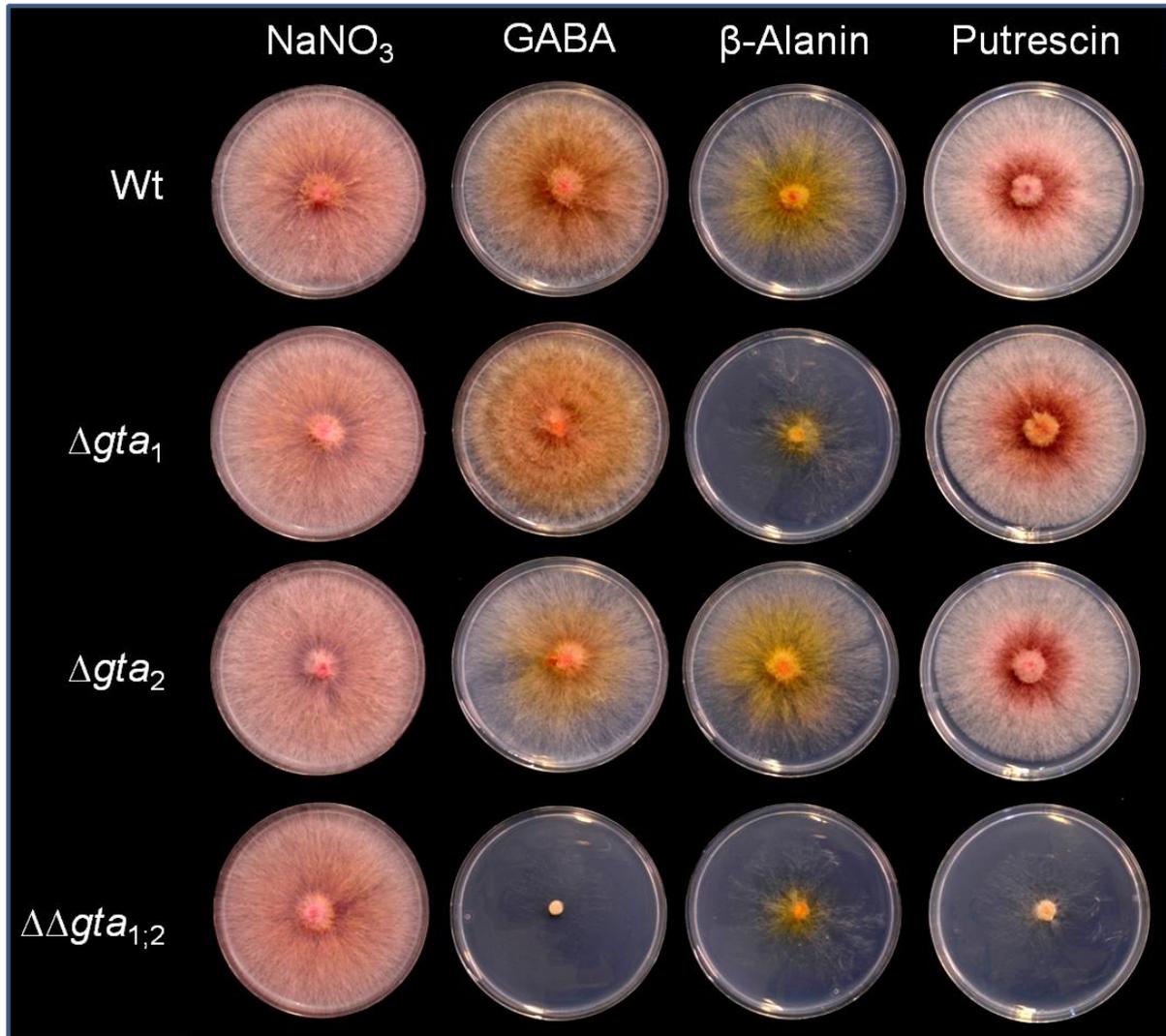


Abbildung 14 Nutzung verschiedener Stickstoffquellen im Minimalmedium (4 dpi). Der Wachstumsphänotyp des Wildtyps sowie der Einzel- (Δgta_1 und gta_2 ,) und Doppelmutanten ($\Delta\Delta gta_{1;2}$) auf Minimalmedium mit den angegebenen Stickstoffquellen. Der Wildtyp-Stamm kann alle Substrate nutzen. Das Wachstum der Δgta_1 -Mutanten ist auf β -Alanin eingeschränkt, während das Wachstum der Δgta_2 -Mutanten auf GABA eingeschränkt ist. Das Wachstum auf NaNO_3 und Putrescin ist bei beiden Einzelausschaltungen und der Doppelausschaltung unverändert zum Wildtyp. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sind sehr stark eingeschränkt im Wachstum auf GABA und Putrescin und zeigen eine ähnliche Wachstumsreduktion wie die Δgta_1 -Mutanten auf β -Alanin.

Analog zum Wachstum mit GABA auf einziger Stickstoffquelle, wurde das Wachstum auf MM-Festmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen verglichen (Abbildung 15). Beim Wachstum auf MM mit GABA als einziger Kohlenstoffquelle kommt es ebenfalls zu einer starken Reduktion im radialen Wachstum der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (Abbildung 15). Zusammengefasst kann GABA daher im Wildtyp sowohl als Stickstoff (N) als auch als Kohlenstoffquelle (C) dienen.

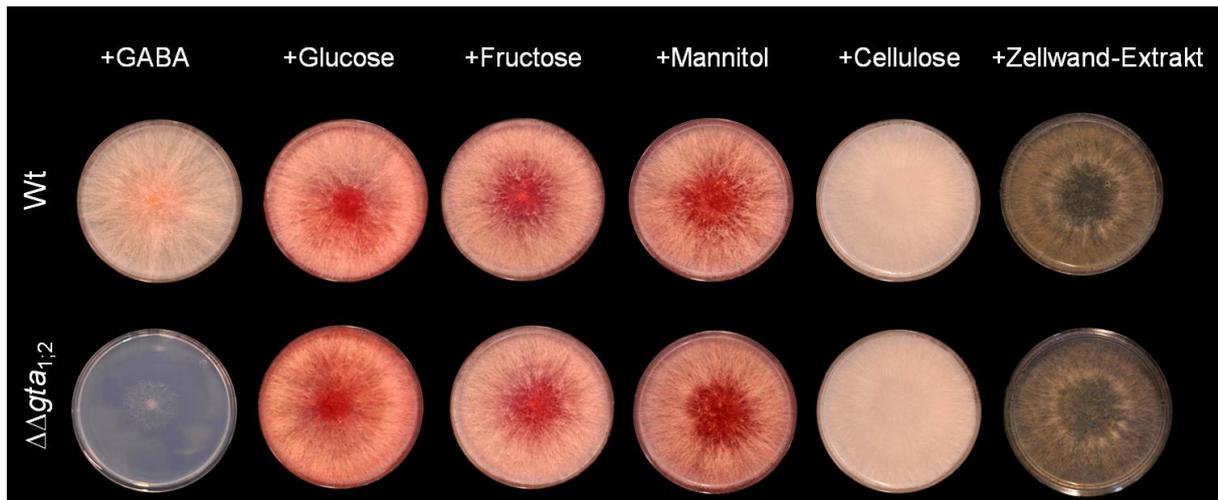


Abbildung 15 Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (C-Quellen) in Minimalmedium (4 dpi). Der Wildtyp konnte alle C- Quellen nutzen. Die $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten zeigten keine Unterschiede im Wachstum auf allen getesteten C-Quellen mit Ausnahme von GABA. Beim Wachstum auf GABA war der radiale Wachstumsdurchmesser der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp-Stamm.

Beim Wachstum auf MM-Festmedium mit Putrescin als einziger Stickstoffquelle konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen den Δgta_1 - sowie Δgta_2 -Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist das Wachstum der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten stark eingeschränkt. Der Polyamin-Abbau mit Putrescin als Intermediat führt daher höchstwahrscheinlich zur Bildung von GABA, welches von den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten nicht mehr umgesetzt werden kann. Ergänzend wurde das Wachstum der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten auf MM-Festmedium mit L-Arginin, L-Ornithin sowie Spermidin als einziger Stickstoffquelle getestet (Abbildung 16).

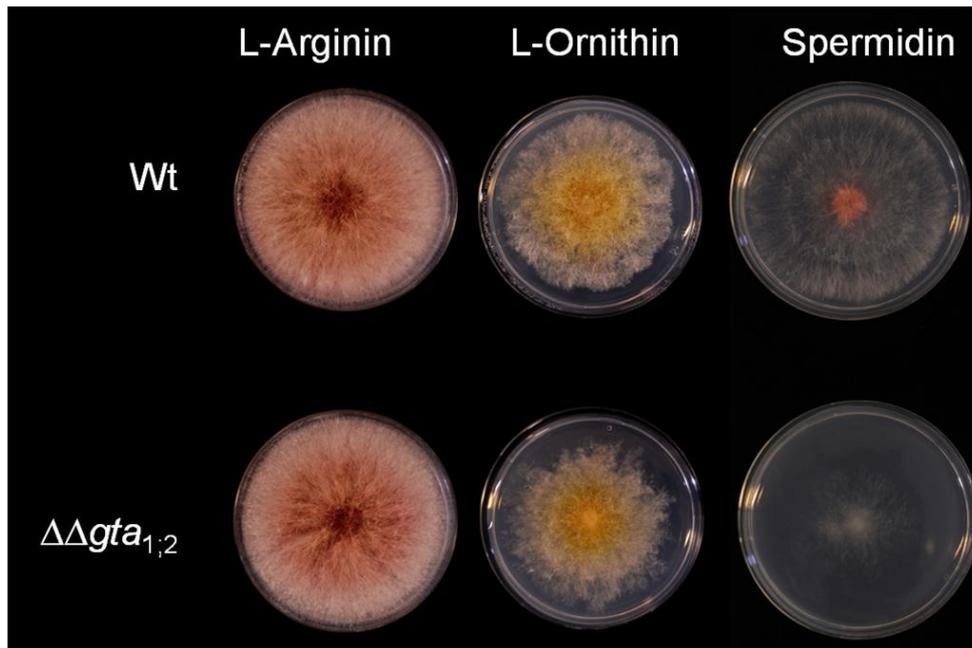


Abbildung 16 Wachstum auf Minimalmedien mit verschiedenen Polyaminen sowie Polyamin-Vorstufen (4 dpi). Der Wildtyp konnte alle Substrate als Stickstoffquellen nutzen. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wuchsen auf L-Arginin sowie L-Ornithin vergleichbar zum Wildtyp. Das radiale Wachstum auf Spermidin war stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp.

Beim Wachstum auf den Vorläufer-Substraten der Polyamin-Synthese, L-Arginin sowie L-Ornithin, wurde kein unterschiedliches Wachstum im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Das radiale Wachstum auf Platten mit dem Polyamin Spermidin war bei den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten eingeschränkt. Die Unterbrechung des GABA-shunts in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten führt zu einem Stopp der Verwertung von GABA und Putrescin und zu einem eingeschränktem Wachstum mit Spermidin.

3.13. Lokalisierung der Transaminasen

Die Vorhersage des Signalpeptides mittels WolfpSort¹ (Protein Subcellular Localization Prediction) ergab eine putative Lokalisierung von *gta-1* in den Mitochondrien, während sich *gta-2* wahrscheinlich im Cytosol befindet. Die Lokalisierung beider Transaminasen wurde in einem MM-GABA Medium überprüft (Abbildung 17). Die Transaminase *gta-1* wird höchstwahrscheinlich in die Mitochondrien importiert. Nach Färbung mit dem Mitochondrien-Farbstoff Rhodamin123 konnten ähnliche Strukturen

¹ <http://wolfpsort.seq.cbrc.jp> (Zugriff: 21.3.2014)

wie bei der *gta-1* Lokalisation gesehen werden. Im Gegensatz dazu bildet *gta-2* stäbchenförmige Strukturen im Cytosol aus. Die gebildeten Strukturen weisen strukturelle Ähnlichkeiten zum filamentösen Zytoskelett auf.

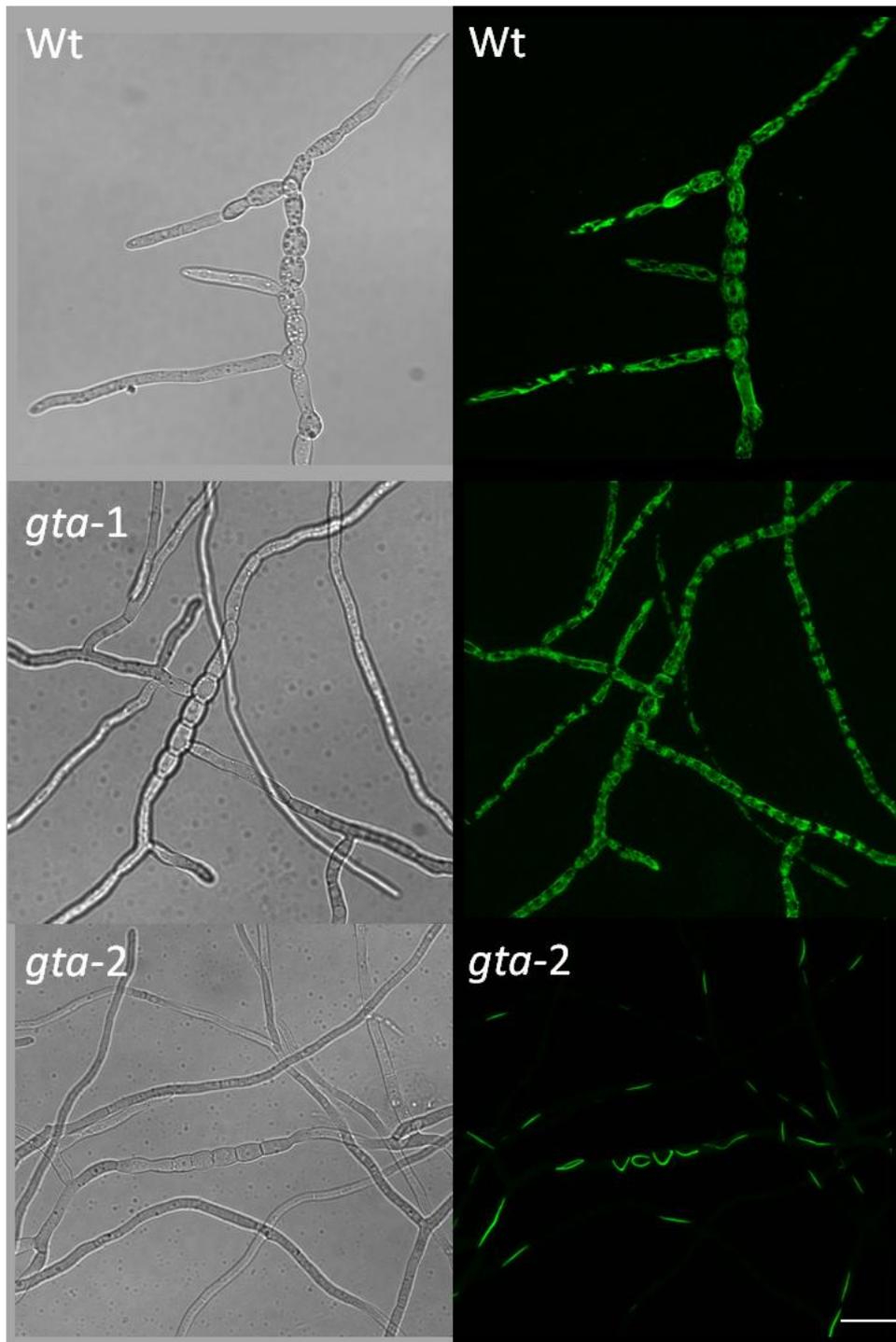


Abbildung 17 Lokalisierung beider Transaminasen. Die Transaminase *gta-1* wird höchstwahrscheinlich in die Mitochondrien importiert. Zum Vergleich wurden die Mitochondrien des Wildtyp-Stammes mit Rhodamin123 angefärbt. Die zweite Transaminase befindet sich nicht in den Mitochondrien sondern bildet stäbchenförmige Strukturen aus. Die Fluoreszenzaufnahmen sind Maximumintensitätsprojektionen aus Einzelaufnahmen. Längenmaßstab: 20 μm .

3.14. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sind sensitiver gegen H_2O_2 Stress und bilden weniger Perithechien, sind jedoch unverändert in der Konidien-Keimungsrate

Die Sensitivität der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten gegenüber Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vermitteltem Stress wurde getestet (Abbildung 18). Zu diesem Zweck wurden CM-Festmedium (Komplettmedium) mit 15 mM H_2O_2 hergestellt. Nach 4 Tagen Inkubation konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen den Δgta_1 , den Δgta_2 -Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist der radiale Wachstumsdurchmesser der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten um ca. 50 % gegenüber dem Wildtyp verkleinert. Die Unterbrechung des GABA-Metabolismus führt daher zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber ROS-Einwirkung.



Abbildung 18 Oxidativer-Stress in CM-Festmedium (4 dpi). Die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress wurde in CM-Festmedium durch Zugabe von 15 mM H_2O_2 überprüft. Auf CM-Festmedium als Kontrolle sind keine Wachstumsunterschiede zwischen dem Wildtyp sowie allen getesteten Mutanten zu finden. Auf CM-Festmedium mit H_2O_2 sind zwischen dem Wildtyp und den Einzelausschaltungen (Δgta_1 und Δgta_2) ebenfalls keine Unterschiede im radialen Wachstumsdurchmesser vorhanden. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sind hingegen sensitiver gegenüber der H_2O_2 .

Während der Fruchtkörper (Perithechien)-Bildung kommt es zu einem transkriptionellen Anstieg von Genen des Energiemetabolismus (Qi *et al.* 2006). Da der GABA-shunt als Nebenweg des TCA-Zyklus beschrieben ist (Bouché und Fromm 2004), wurde die Fähigkeit der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten, Perithechien zu bilden, überprüft. Die Bildung der Perithechien wurde auf Karottenagar getestet (Cavinder *et al.* 2012). Nach

21 Tagen bildete der Wildtyp zahlreiche Perithezien sowie Perithezien-Cluster aus. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten hingegen bildeten nach 21 Tage nur äußerst vereinzelt Perithezien. Die Quantität der gebildeten Perithezien ist damit abhängig von einem funktionierenden GABA-Metabolismus. Ein funktioneller GABA-Metabolismus ist damit zwar nicht essenziell für die Bildung, beeinflusst aber die Menge der gebildeten Perithezien.

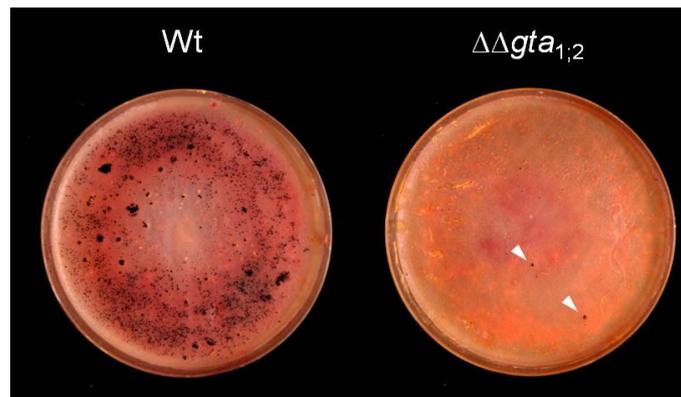


Abbildung 19 Perithezien-Bildung auf Karottenagar. Nach 21 Tagen bildete der Wildtyp (links) zahlreiche Perithezien sowie Perithezien-Cluster aus. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (rechts) bildeten nur vereinzelt Perithezien aus (Pfeile).

Nach der Bildung von Perithezien wurde die Keimungsrate der Konidien auf CM-Festmedium überprüft (Tabelle 3).

Tabelle 3 Keimungsrate der Konidien auf CM-Festmedium

Stamm	Gekeimte Konidien (%)	Standardabweichung	Signifikanz ($p < 0,05$)
Wildtyp	76.11	13.40	Nein
$\Delta\Delta gta_{1;2}$ A	66.66	10.54	Nein
$\Delta\Delta gta_{1;2}$ B	63.88	13.89	Nein
$\Delta\Delta gta_{1;2}$ C	67.22	9.05	Nein

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sowie dem Wildtyp festgestellt werden.

3.15. Die Unterbrechung des GABA-Stoffwechsels in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten führt zu einer intrazellulären GABA-Akkumulation

Die Verstoffwechslung von GABA wurde in den Doppelmutanten mittels HPLC im Kulturüberstand sowie intrazellulär im zeitlichen Verlauf untersucht (Abbildung 20). Zu diesem Zweck wurden Kulturen des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten in YPG-Vollmedium kultiviert und nach 3 Tagen in ein GABA-MM-Flüssigmedium überführt. Unmittelbar nach dem Kulturstart sank die gemessene GABA-Konzentration im Überstand des Wildtyps von $44,33 \pm 0,48 \mu\text{g ml}^{-1}$ auf $33,14 \pm 1,57 \mu\text{g ml}^{-1}$ sowie in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten von $45,32 \pm 1,21 \mu\text{g ml}^{-1}$ auf $37,31 \pm 4,58 \mu\text{g ml}^{-1}$ im Verlauf von 2 Stunden ab. Nach vier Stunden zeigten sich erste signifikante Unterschiede im Metabolismus zwischen Wildtyp und den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten. Im Wildtyp fiel die GABA-Konzentration von $14,81 \pm 1,13 \mu\text{g ml}^{-1}$ nach 4 Stunden weiter ab und lag nach 6 Stunden unter dem Detektionslimit ($0,33 \pm 0,21 \mu\text{g ml}^{-1}$). Im Gegensatz dazu blieb die gemessene GABA-Konzentration in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nach dem anfänglichen Abfall auf konstant hohem Niveau und lag nach 6 Stunden bei $45,52 \pm 0,31 \mu\text{g ml}^{-1}$. Obwohl beide Stämme anfänglich beginnen, GABA aus dem Außenmedium aufzunehmen, wird die weitere Aufnahme in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten frühzeitig unterbrochen. Um zu prüfen, ob die Aufnahme von GABA in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration stattfindet, wurde die GABA-Konzentration im zeitlichen Verlauf im Myzel bestimmt.

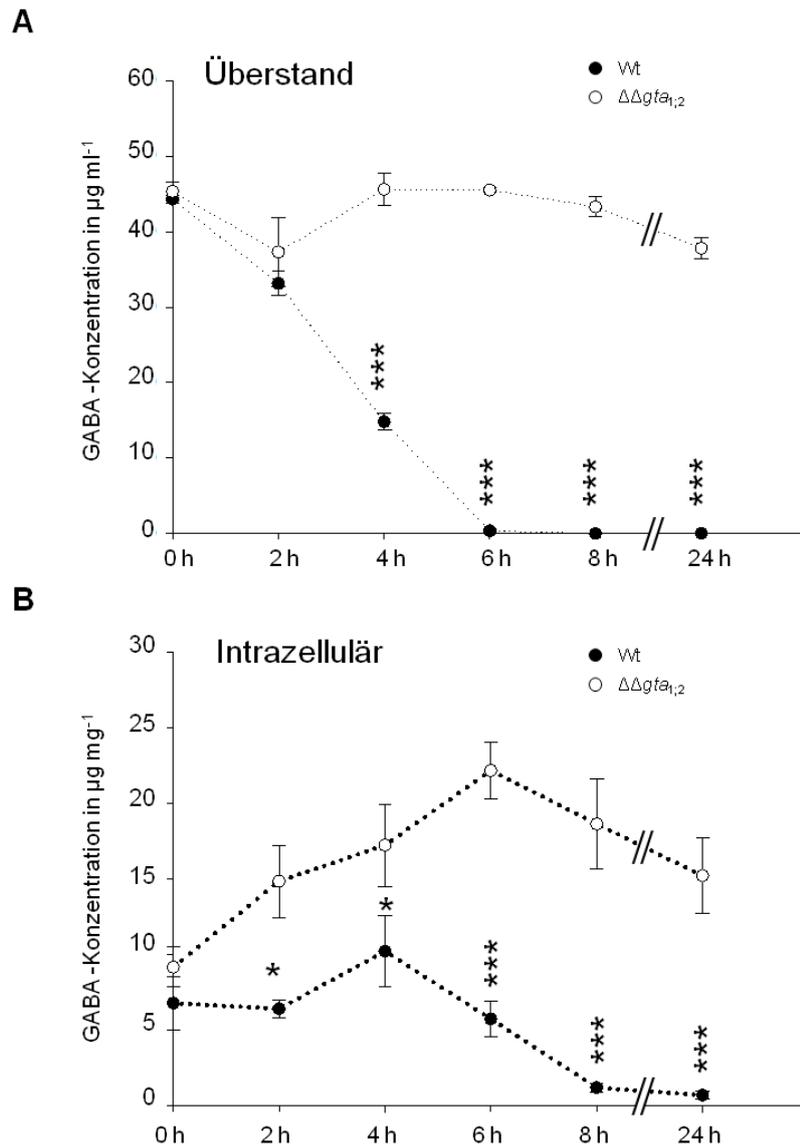


Abbildung 20 Bestimmung der GABA-Konzentrationen im Wildtyp und in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten. Die GABA-Konzentration wurde *in vitro* in GABA-MM im Kulturüberstand (**A**) sowie intrazellulär im Myzel (**B**) mittels HPLC analysiert. **A.** *In vitro* in GABA-MM wurde GABA vom Wildtyp schnell aufgenommen und war nach 6 h nicht mehr im Medium detektierbar. Die $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten nahmen nur anfänglich (0-2 h) GABA aus dem Außenmedium auf. Im zeitlichen Verlauf blieb die GABA-Konzentration im Außenmedium der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten mit kleineren Schwankungen konstant. **B.** In GABA-MM stieg die intrazelluläre Konzentration von 0-4 Stunden im Myzel beider Stämme an. Die Aufnahme in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten begann dabei zeitlich vor dem Wildtyp. Nach 4 Stunden sank die GABA-Konzentration im Wildtyp ab und erreichte nach 8 Stunden Werte unterhalb der Detektionsschwelle. Im Gegensatz dazu stieg die GABA-Konzentration in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten bis 6 Stunden weiter an und blieb bis zum Ende des Experimentes (24 h) signifikant erhöht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung in allen Experimenten. Die Experimente **A** und **B** wurden mit einer $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutante sowie dem Wildtyp in drei biologischen Replikaten für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Die Signifikanz für die Experimente **A** und **B** wurde mittels Student's t-Test berechnet.

Ausgehend von der Konzentration bei Induktionsstart ($6,77 \pm 1,76 \mu\text{g ml}^{-1}$) bleibt die intrazelluläre GABA-Konzentration im Wildtyp bis zum 2-Stunden-Zeitpunkt nahezu konstant ($6,34 \pm 0,58 \mu\text{g ml}^{-1}$). 4 Stunden nach Induktionsstart steigt die Konzentration auf $10,22 \pm 2,34 \mu\text{g ml}^{-1}$ an. Von 4-6 Stunden sinkt die intrazelluläre GABA-Konzentration wieder ab und erreicht nach 6 Stunden $5,73 \pm 1,16 \mu\text{g ml}^{-1}$. Nach 8 Stunden sind noch $1,18 \pm 0,32 \mu\text{g ml}^{-1}$, nach 24 Stunden nur noch Spuren detektierbar ($0,67 \pm 0,26 \mu\text{g ml}^{-1}$). In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten steigt die GABA-Konzentration von $9,16 \pm 1,32 \mu\text{g ml}^{-1}$ zum Induktionsstart auf $14,85 \pm 2,39 \mu\text{g ml}^{-1}$ an. Nach 4 Stunden wurde in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten $17,32 \pm 2,73 \mu\text{g ml}^{-1}$ gemessen und nach 6 Stunden bereits $22,18 \pm 1,89 \mu\text{g ml}^{-1}$ detektiert. Von 0-6 Stunden steigt die intrazelluläre GABA-Konzentration in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten im Zeitverlauf an. Nach 6 Stunden beginnt die GABA-Konzentration leicht abzufallen und erreicht nach 8 Stunden $18,64 \pm 2,99 \mu\text{g ml}^{-1}$. Bis zum Ende des Experimentes (24 Stunden) bleibt die Konzentration in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten signifikant erhöht ($15,21 \pm 2,45 \mu\text{g ml}^{-1}$). In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten findet daher eine konzentrationsabhängige Hemmung der weiteren GABA-Aufnahme statt.

3.16. Die Gene des GABA-shunt sind in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten *in vitro* stärker induziert

Mittels der HPLC-Messungen konnte gezeigt werden, dass die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten GABA aufnehmen und intrazellulär akkumulieren. Untersucht werden sollte daher, ob infolge der intrazellulären Akkumulation eine Änderungen im Expressionsprofil der putativen GABA-shunt-Gene auftritt. Die im Folgenden gezeigten Expressionsdaten sind als relative Expressionsanstiege im Vergleich zur Wildtyp-Expression des jeweiligen Gens angegeben. Im Vergleich zum Wildtyp führt die Induktion mit MM-GABA in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten zu einem Anstieg der Expression der Gene für die SSADH-1 (Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase; $8,89 \pm 0,06$) für die SSADH-2 ($20,24 \pm 0,04$), für die SSADH-3 ($4,82 \pm 0,02$) sowie für die putative GABA-Permease GAP ($2,90 \pm 0,02$). Die GAD (Glutamat-Decarboxylase) ist in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nicht signifikant verändert ($1,27 \pm 0,027$).

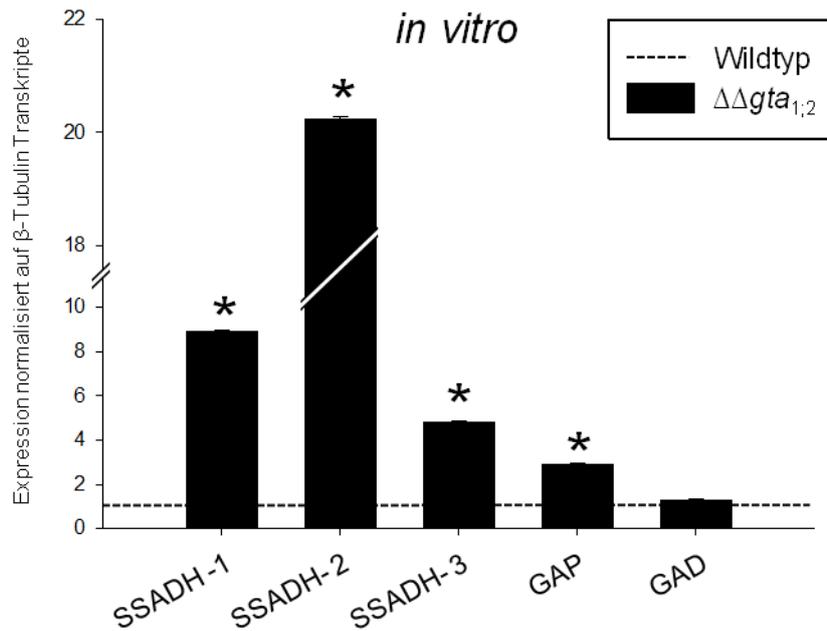


Abbildung 21 Expression der GABA-shunt-Gene *in vitro*. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von drei potentiellen Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenasen (SSADH 1-3), einer putativen GABA-Permease (GAP) sowie einer putativen Glutamat-Decarboxylase (GAD) bestimmt. In GABA-MM steigt die Expression aller Gene *in vitro* in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten mit Ausnahme der GAD signifikant in Relation gegenüber dem Wildtyp (auf 1 gesetzt) an. Ein Stern stellt eine signifikante Veränderung nach dem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl *et al.* 2002) dar. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Die Unterbrechung des GABA-Metabolismus in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten führt damit nicht zu einer verringerten Expression der nachgeschalteten Enzyme, sondern im Gegenteil, zu einer starken Induktion.

3.17. Der globale Stickstoffregulator AreA steuert die Expression der GABA-shunt-Gene

In filamentösen Pilzen wird die Verwertung vieler Stickstoffquellen über den globalen Stickstoffregulator AreA gesteuert (zusammengefasst durch Marzluff 1997). Es wurde daher untersucht, ob der GABA-Metabolismus ebenfalls unter Kontrolle von AreA steht. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von Deletionsmutanten von AreA (Dr. Jörg Bormann, Universität Hamburg) auf MM-Festmedium mit GABA getestet. Der

radiale Wachstumsdurchmesser der Δ AreA-Mutanten ist stark verringert beim Wachstum auf GABA als einziger Stickstoffquelle (Abbildung 22 B).

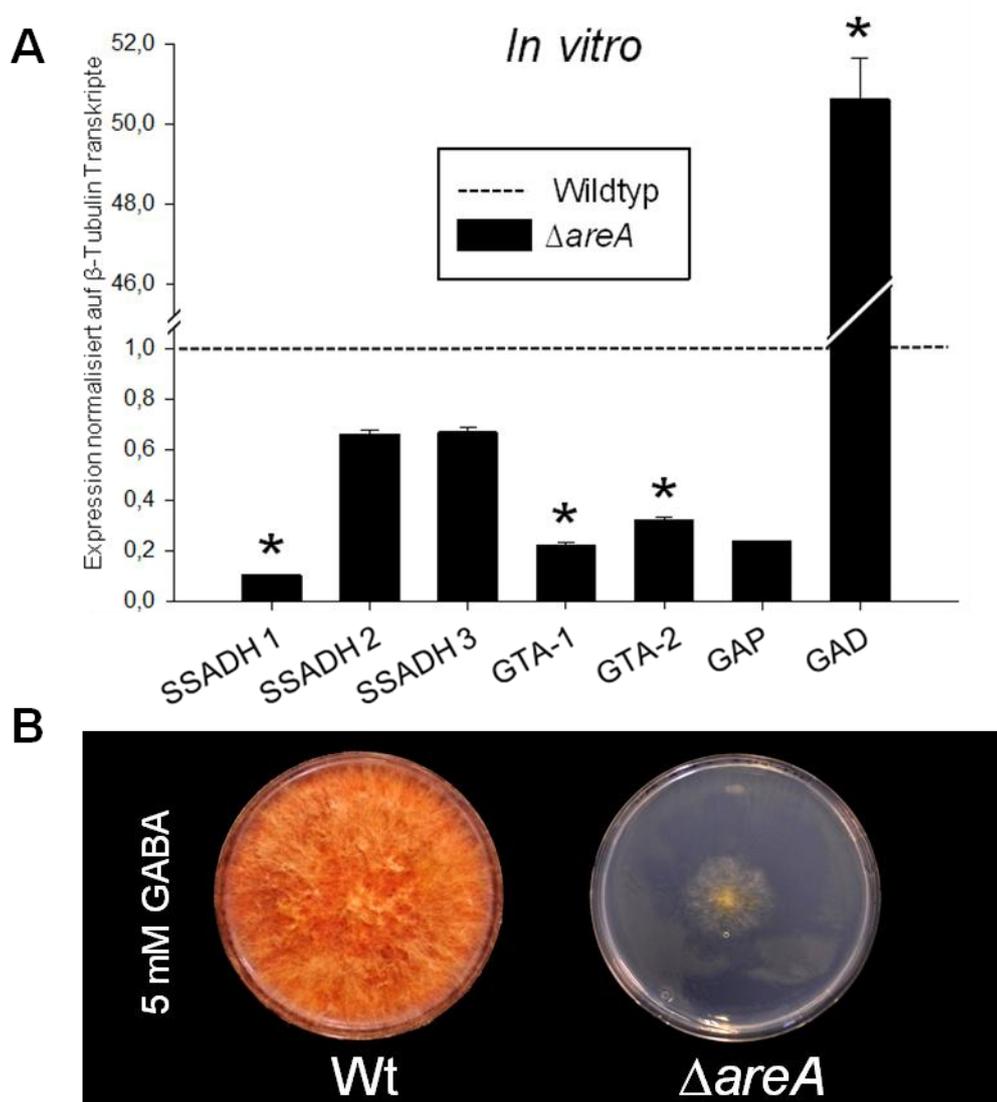


Abbildung 22 Expression der GABA-shunt-Gene in der Δ AreA-Mutante sowie Wachstum auf Festmedium. **A.** Unter GABA induzierenden Bedingungen *in vitro* sinkt die Expression der GABA-shunt-Gene in einer Δ AreA-Mutante gegenüber dem Wildtyp (Werte wurden auf 1 gesetzt) ab. Die Expression der GAD steigt im Gegensatz auf das 50,62fache der Wildtyp-Expression an. Ein Stern stellt eine signifikante Veränderung nach dem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl *et al.* 2002) dar. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. **B.** Das Wachstum wurde auf Minimalmedium mit GABA als einziger Stickstoffquelle überprüft (4 dpi). Das Wachstum der Δ AreA-Mutante ist auf GABA als einziger Stickstoffquelle stark eingeschränkt.

Um zu untersuchen, ob AreA wichtig für die transkriptionelle Steuerung der GABA-shunt-Gene ist, wurde deren Expression in der AreA-Deletionsmutante nach Induk-

tion mit GABA untersucht (Abbildung 22 A). Sämtliche Gene des GABA-shunts werden von AreA positiv reguliert, die Ausschaltung führt zu einer verringerten Expression der SSADH-Gene 1-3, beider GABA-Transaminasen sowie einer putativen GABA-Permease. Im Gegensatz dazu steht die massiv hochregulierte Expression der GAD ($50,62 \pm 1,03$). Der GABA-Metabolismus wird positiv durch AreA gesteuert, wohingegen die Decarboxylierung von Glutamat über die GAD einer negativen Regulation unterliegt.

3.18. GABA induziert die DON-Synthese *in vitro*

Die Infektion von Weizen mit *F. graminearum* führt zur Bildung von Polyaminen, die eine Rolle im pflanzlichen Stressmetabolismus spielen (Gardiner *et al.* 2011, Walters 2003). Durch die Zugabe von verschiedenen Polyaminen konnte in der Kultur eine starke Induktion der DON-Biosynthese angeregt werden (Gardiner *et al.* 2009).

Der Abbau von Putrescin als Zentralmetabolit des Polyamin-Katabolismus geschieht über GABA (Abbildung 14). Werden YPG-Vorkulturen in ein MM-Flüssigmedium mit Putrescin-Dihydrochlorid überführt, bilden die Wildtyp-Kulturen nach 3 Tagen 117 mg kg⁻¹ DON, während im Überstand der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nur 0,50 mg kg⁻¹ DON nachgewiesen werden konnten (Abbildung 23). Wird das Experiment mit GABA als einziger Stickstoffquelle wiederholt, kommt es zur Bildung von 91 mg kg⁻¹ DON in den Wildtyp-Kulturen. Im Gegensatz dazu werden in den Kulturen der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nur 1,3 mg kg⁻¹ DON detektiert. Die Toxin-Synthese ist daher sowohl mit Putrescin-Dihydrochlorid als auch mit GABA induzierbar. Bei Zugabe von Putrescin-Dihydrochlorid kommt es in $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nicht zu einem Anstieg der Toxin-Synthese, was den Schluss nahelegt, dass die Putrescin-Dihydrochlorid-Wirkung über GABA vermittelt wird.

Ergebnisse

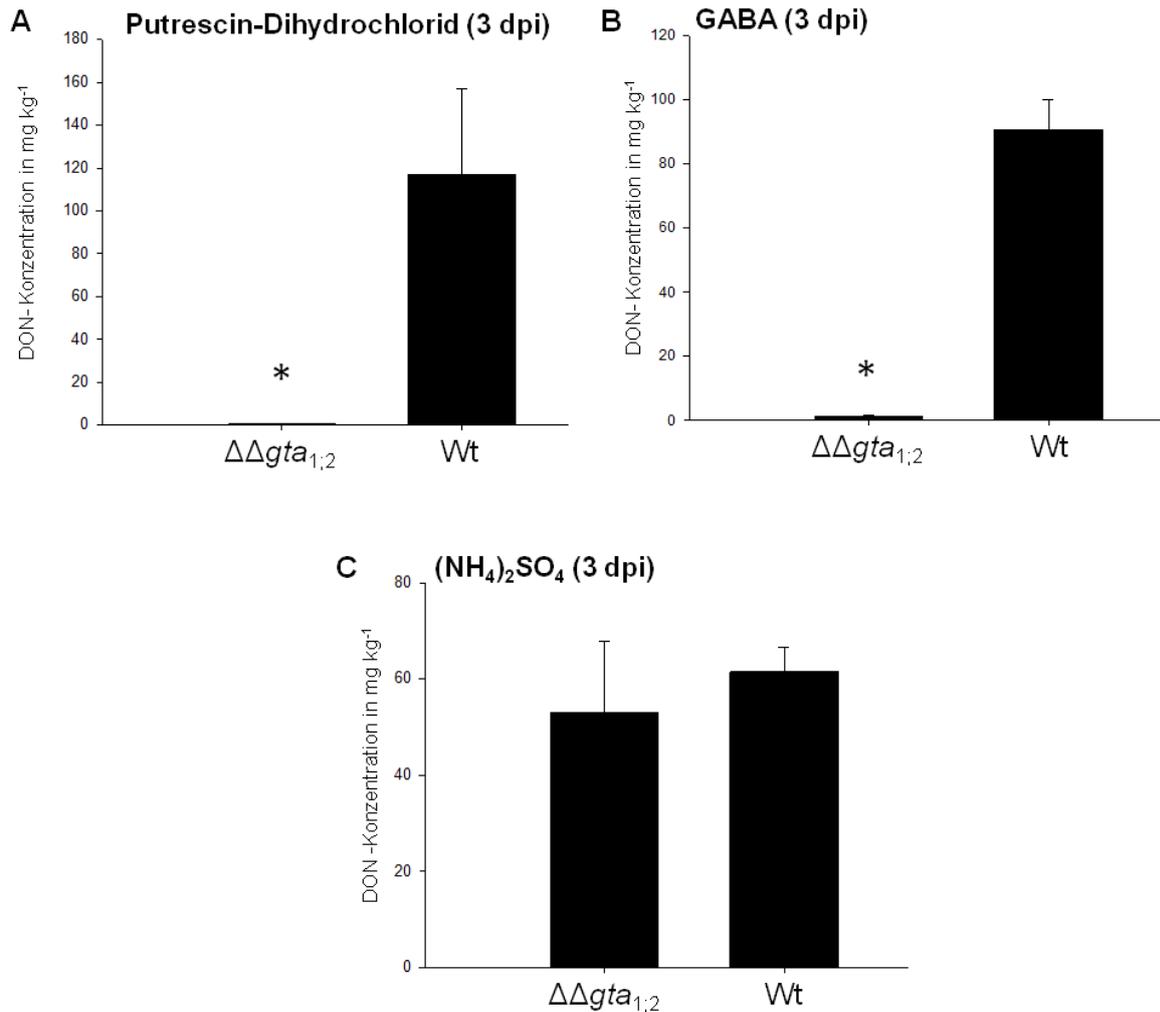


Abbildung 23 Deoxynivalenol Konzentration des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten *in vitro* (A-C). Die Deoxynivalenol-Biosynthese (DON) wurde *in vitro* in einem Minimalmedium durch Zugabe von Putrescin-Dihydrochlorid (A), GABA (B), sowie (NH₄)₂SO₄ (C) als jeweils einzige Stickstoffquelle induziert. Nach drei Tagen wurde die DON-Konzentration gemessen. In den Wildtyp-Kulturen wurde die DON-Synthese nach Zugabe von Putrescin-Dihydrochlorid sowie GABA induziert (A-B). In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wurde in beiden Medien statistisch deutlich weniger DON gebildet. C. Wird (NH₄)₂SO₄ zur Induktion eingesetzt, sind die DON-Mengen zwischen beiden Stämmen vergleichbar. Die DON-Konzentrationen im Überstand wurden normalisiert auf das jeweilige Trockengewicht. Die Fehlerbalken repräsentieren in allen Experimenten die Standardabweichung. Die Experimente A-C wurden mit drei unabhängigen Mutanten mit jeweils 3 biologischen Replikaten für jeden Stamm durchgeführt. Das gesamte Experiment wurde insgesamt zweimal wiederholt. Die statistische Signifikanz wurde berechnet mittels Mann-Whitney-Rang-Summen Test (p < 0,05).

Die Bildung von DON kann auch durch Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ induziert werden (Covarelli *et al.* 2004, Ilgen *et al.* 2009). Die Induktion mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ führt zu vergleichbaren DON-Mengen in den Kulturen beider Stämme (Wildtyp: $61,47 \text{ mg kg}^{-1}$ DON, $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten $52,89 \text{ mg kg}^{-1}$ DON) (Abbildung 23). Dieses Resultat zeigt, dass mehrere unabhängige Wege zur Induktion des Tri-Clusters führen. Die Polyamin-Induktion wird dabei über GABA vermittelt, während die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Induktion unabhängig vom GABA-shunt stattfindet.

3.19. Die *in vitro* GABA-Aufnahme führt zu einem Absinken des pH-Wertes

Die Induktion der DON-Biosynthese findet häufig in Medien mit einem sauren pH statt (Gardiner *et al.* 2009). Um zu überprüfen, ob Veränderungen im pH-Wert ursächlich für die verringerte DON-Synthese der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sind, wurden die Veränderungen des pH-Wertes in jedem eingesetzten DON-Induktionsmedium gemessen (Abbildung 24).

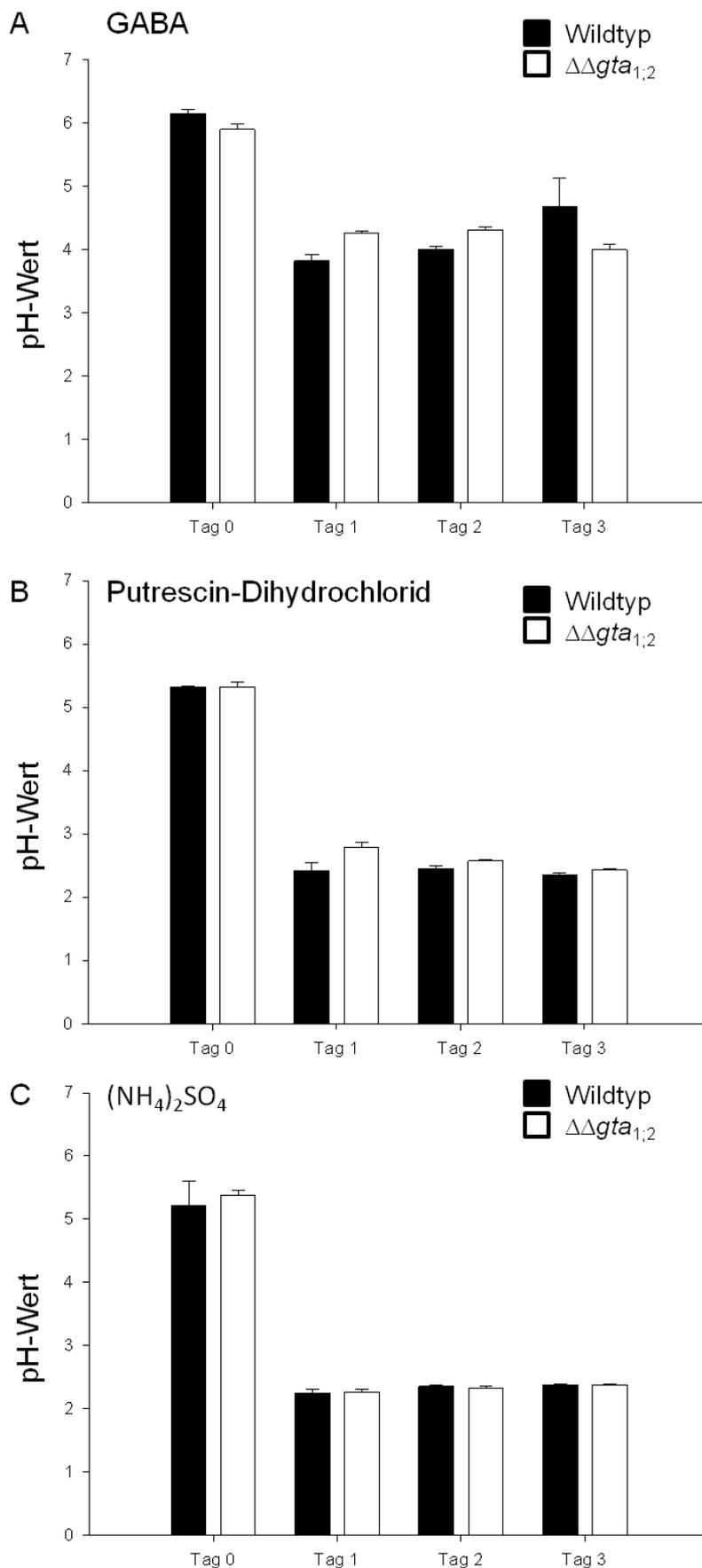


Abbildung 24 Entwicklung des pH-Wertes in MM mit A. (GABA) B. (Putrescin-Dihydrochlorid) C. $(NH_4)_2SO_4$. Der pH-Wert fällt in allen eingesetzten Medien im zeitlichen Verlauf. Die Werte zwischen Wildtyp und den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ sind nicht signifikant verschieden. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit drei unabhängigen Mutanten mit jeweils 3 biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren in allen Experimenten die Standardabweichung.

Wird GABA als einzige Stickstoffquelle eingesetzt, kommt es zu einer Ansäuerung des Kulturmediums von pH 6 auf ca. pH 4. Diese Tendenz ist stärker ausgeprägt bei Verwendung von Putrescin-Dihydrochlorid (ca pH 5,3 auf pH 2,3) sowie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 5,3 auf pH 2,3). In allen Fällen findet die Ansäuerung sowohl in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten als auch im Wildtyp statt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden eingesetzten Stämmen detektiert. Ursächlich für die veränderte DON-Produktion *in vitro* sind daher nicht die Unterschiede im pH-Wert, sondern der unterbrochene GABA-Metabolismus.

3.20. Die Virulenz der $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten auf Weizen ist stark verringert

Die Überprüfung der Virulenz der Einzel- sowie Doppelmutanten erfolgte mit dem suszeptiblen Weizenkultivar *Nandu*. Weizenähren wurden während der Blütezeit mit Konidien des jeweiligen Stammes infiziert. Nach 21 Tagen erfolgte die Evaluation des Schadbildes anhand der symptomatischen Blüten im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der Blüten der jeweiligen Ähre. Die erhobenen Prozentwerte wurden in 6 Schadklassen eingeteilt. Unterschieden wurden die Schadklasse-1 von 0-10 % Infektion (entspricht ca. nur den inokulierten Blüten mit Symptomen) bis hin zur höchsten Schadklasse-6 mit 80-100 % Infektion (nahezu die komplette Ähre zeigt FHB-Symptome) eingeteilt (Abbildung 25). Die Mehrheit der mit dem Wildtyp infizierten Ähren (80,1 %) findet sich in den Schadklassen 5-6 mit den höchsten FHB-Symptomen. Die Auswertung der mit den Δgta_1 ; sowie Δgta_2 -Mutanten infizierten Ähren ergab keinerlei Änderung gegenüber den Wildtyp-Infektionen. Die Infektion mit den Δgta_1 -Mutanten befanden sich zu 82,8 % in den Schadklassen 5-6, im Vergleich zu 75,8 % bei der Infektion mit den Δgta_2 -Mutanten.

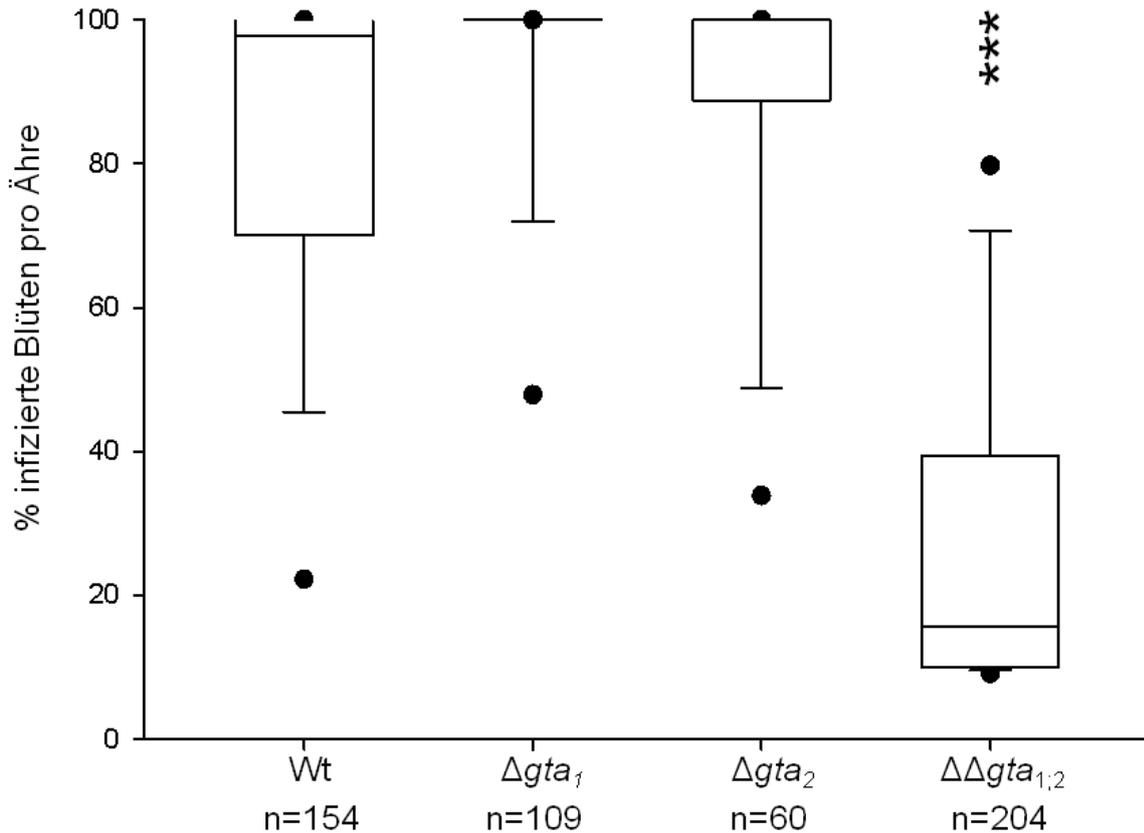


Abbildung 25 Statistische Auswertung der Infektionsversuche auf Weizen (Kultivar *Nandu*).

Nach 21 Tagen wurden die inokulierten Ähren geerntet und die Prozentzahl der infizierten Blüten pro Ähre bestimmt. Die Grenzen des Box-Plots sind der Interquartilsabstand (25. bis 75. Perzentile) während die Whiskers als 90. beziehungsweise 10. Perzentile dargestellt sind. Infizierte Ähren außerhalb der 5. und 95. Perzentile sind als Punkte dargestellt. Der Median der jeweiligen Infektionen ist als horizontale Linie eingezeichnet. In den Δgta_1 -Mutanten sind 82,8 % aller Infektionen im Bereich von 60-100 % symptomatische Blüten. In den Δgta_2 -Mutanten sind 75,8 % im Bereich von 60-100 %. Die Wildtyp-Infektion führt zu 80,1 % symptomatischen Blüten (60-100 % Infektion). Die Infektion mit den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten führt im Gegensatz zur Infektion mit den Einzelmutanten sowie dem Wildtyp zu einer Anhäufung (69,3 %) im Bereich von 0-20 % symptomatischer Blüten. Diese Reduktion in der Virulenz ist höchst statistisch signifikant (Man Whitney U-Test mit $p < 0,001$)

Die Lageverteilung der Infektionen mit dem Wildtyp sowie den Einzelmutanten zeigt eine extrem links-schiefe Verteilung, wobei der Großteil der befallenen Ähren im Bereich der hohen Schadklassen 5-6 (maximale FHB-Symptomatik) gruppiert sind. Im Gegensatz zu den Δgta_1 - und Δgta_2 -Mutanten sind die $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten stark in ihrer Virulenz reduziert. Die Anzahl der Ähren mit ausgeprägten FHB-Symptomen ist stark reduziert gegenüber dem Wildtyp. Die Prozentzahl der infizierten Ähren der Schadklassen 1-2 liegt bei den mit den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten infizierten Ähren bei 69,3 %. Dieser Unterschied ist statistisch höchst signifikant. Der Großteil der Infek-

tionen gruppiert sich daher in den Schadklasse-1 (Infektion der inokulierten Blüten) bis zur Schadklasse-2 (10-20 % Infektion, Infektion beider Nachbarblüten). Im Gegensatz zur Verteilung der Wildtyp-Infektionen ist die Verteilung der Prozentwerte der Doppelmutanten stark rechts-schief.



Abbildung 26 Virulenz-Untersuchung auf Weizen (Kultivar *Nandu*) Weizenblüten wurden in der Wachstumsphase 65-69 (Zadkos *et al.* 1974) mit Konidien von 3 unabhängigen Δgta_1 -Mutanten, 2 unabhängigen Δgta_2 -Mutanten sowie 4 unabhängigen $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten inokuliert. Wildtyp-infizierte Ähren dienten als Positivkontrolle, Wasser inokulierte Ähren dienten als Negativkontrolle. Nach 21 Tagen zeigten die Ähren, die mit dem Wildtyp-Stamm sowie den Einzelmutanten infiziert worden waren, typische Symptome der Ährenbleiche. Die Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten war reduziert und beschränkte sich im Mittel auf die inokulierte Blüte sowie die Nachbarblüte. Die Pfeile geben die jeweils inokulierten Blüten an.

Der GABA-Metabolismus ist daher wichtig für die Kolonisierung der Weizenähre. Beide Transaminasen sind folglich synergistisch nötig für die Infektion der Weizenähre. Die Ausschaltung der einzelnen Transaminasen führt nicht zu einer Reduktion in der Virulenz.

3.21. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten bilden vergleichbare DON-Mengen wie der Wildtyp-Stamm

In vitro führt die Unterbrechung des GABA-Metabolismus in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten zu einer stark verringerten Toxin-Synthese bei Zugabe von Putrescin-Dihydrochlorid oder GABA (Abbildung 23).

Die signifikant verringerte Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten während der Weizeninfektion könnte durch eine verringerte DON-Synthese verursacht werden. Es wurden daher Weizenähren mit dem Wildtyp sowie den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten inokuliert und nach 5 beziehungsweise 10 dpi geerntet, die DON-Konzentration gemessen und über den Menge an genomischer *F. graminearum* DNA normalisiert (Voigt *et al.* 2007). Im Gegensatz zu den stark unterschiedlichen DON-Konzentrationen nach GABA-Zugabe in Kultur, bilden die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sowie der Wildtyp vergleichbare DON-Mengen (ca. 200 mg kg⁻¹ DON) bei der Weizeninfektion nach 5 dpi. Um herauszufinden, ob die DON-Produktion im Laufe der weiteren Infektion verschieden ist, wurden infizierte Ähren 10 dpi geerntet. Nach Normalisierung ergibt sich wiederum eine vergleichbare DON-Konzentration (Wildtyp: 123 mg kg⁻¹ DON, $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten 118 mg kg⁻¹ DON).

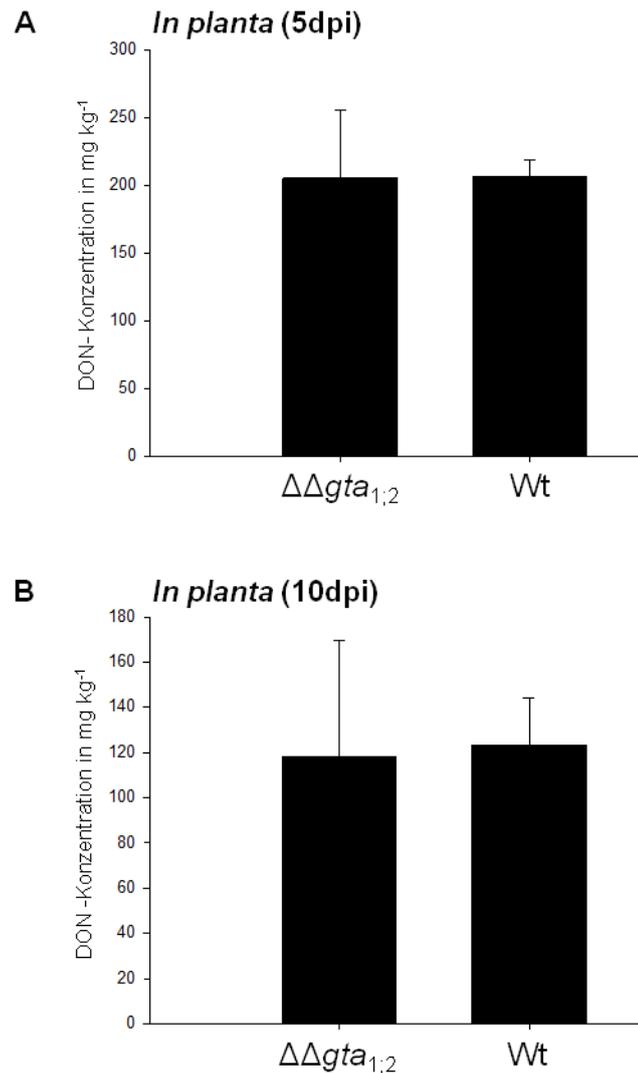


Abbildung 27 Deoxynivalenol-Konzentration des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten während der Weizenblüteninfektion (A und B). Im Verlauf der der Weizenblüten-Infektion werden sowohl während der frühen Infektion (5 dpi, **A**) als auch zu einem späteren Zeitpunkt (10 dpi, **B**) keine signifikant unterschiedlichen DON-Mengen gebildet. Die DON-Konzentrationen *in planta* wurden anhand der Menge an pilzlichem β -Tubulin mittels q-PCR quantifiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren in allen Experimenten die Standardabweichung. Das Experiment **A** wurde mit drei unabhängigen Mutanten mit jeweils zusammengeführten Blüten für jede Mutante sowie den Wildtyp durchgeführt. Das Experiment **B** wurde mit drei unabhängigen Mutanten mit jeweils 10 Ähren für jede Mutante und den Wildtyp durchgeführt (n=40). Die statistische Signifikanz wurde berechnet mittels Mann-Whitney-Rang-Summen Test ($p < 0,05$).

Mittels qRT-PCR wurde die Expression ausgewählter Gene des Tri-Cluster (Tri4, *Tri5*, Tri6, Tri10 (Trichodien Oxigenase, Trichodien Synthase, zwei Transkriptionsfaktoren des Tri-Clusters) nach 5 dpi überprüft (Tabelle 4).

Tabelle 4 Expression der Tri-Gene in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (5 dpi)

Gen	Absolute Regulation (im Vergleich zum Wildtyp)	Standardabweichung
Tri4	-1,00	0,40
Tri5	-1,06	0,14
Tri6	1,10	0,18
Tri10	1,08	0,06

Keines der überprüften Gene war in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten gegenüber dem Wildtyp signifikant verändert. Die verringerte Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist damit nicht auf eine veränderte DON-Biosynthese zurückzuführen, sondern beruht auf anderen Mechanismen.

3.22. Histologische Untersuchungen des frühen Infektionsverlaufs

Um den frühen Infektionsverlauf zu untersuchen, wurden Weizenähren mit Konidien eines konstitutiv DsRed-exprimierenden $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten-Stamm und einem konstitutiv DsRed-exprimierenden Wildtyp-Stamm (B. Hadeler, Universität Hamburg) inokuliert. Zehn dpi wurden die Proben geerntet und der Infektionsverlauf wurde mittels eines Fluoreszenz-Stereomikroskops visualisiert (Abbildung 28).

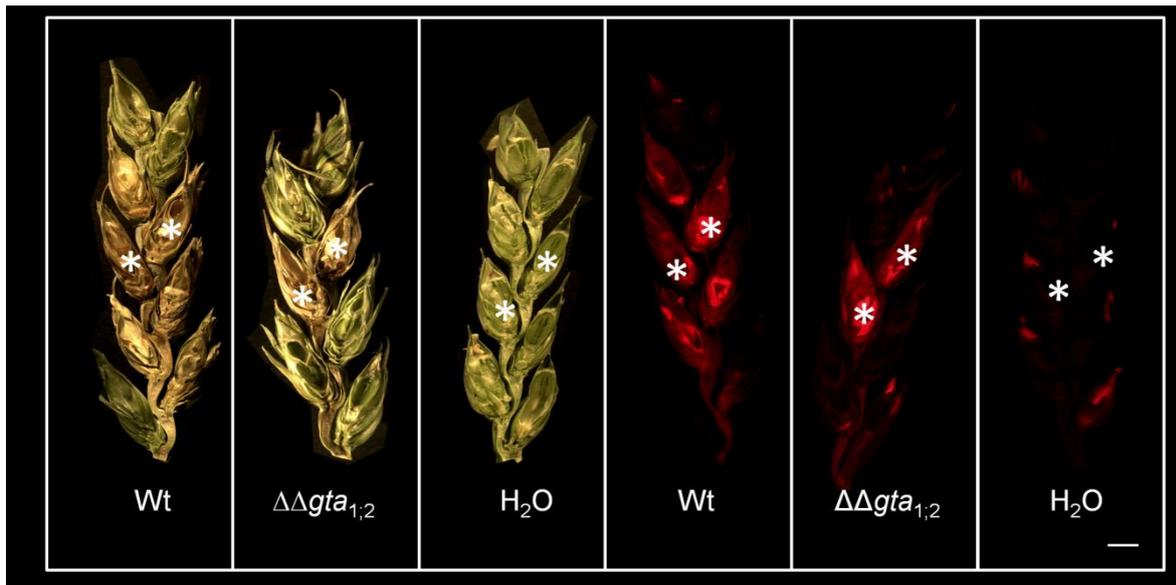


Abbildung 28 Untersuchung der frühen Infektion mit dem Wildtyp (Wt) sowie einer $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutante (10 dpi). Weizenblüten wurden punktinokuliert mit Stämmen, die das fluoreszierende Protein DsRed konstitutiv im Cytosol bilden. Wasserinokulierte Ähren dienten als Kontrolle. Die Blüten wurden longitudinal geschnitten und die Blüten um die Inokulationsstelle (Stern) mithilfe eines Fluoreszenz-Stereomikroskops untersucht. Während der frühen Infektion kolonisiert der Wildtyp die inokulierten Ähren sowie die angrenzenden Blüten sowie die Rachis. Alle stark kolonisierten Blüten zeigten die Bildung von Nekrosen (Hellfeld), die mit der Detektion des Pilzstammes nach Fluoreszenz-Anregung (DsRed) korrelierte. Im Gegensatz zur Infektion des Wildtyp-Stammes verläuft die Kolonisierung des Weizengewebes durch die $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten langsamer. Nach 10 Tagen sind nur die inokulierten Blüten infiziert, während die Nachbarblüten noch nicht kolonisiert wurden. Längenmaßstab: 5 mm.

Die Infektion mit dem Wildtyp-DsRed-Stamm führt zur Detektion von Fluoreszenzsignalen außerhalb der inokulierten Ähren, die mit der Bildung von Nekrosen im Hellfeldbild korrelieren. Das Wachstum geht dabei in die angrenzenden Ähren sowie das Leitgewebe der Ähre über. Im Gegensatz dazu ist die Infektion der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten zu diesem Zeitpunkt auf die inokulierten Ähren beschränkt. Nach 21 dpi haben die $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten im Durchschnitt die inokulierten Blüten sowie die beiden angrenzenden Blüten kolonisiert.

3.23. GABA wird während der Weizenblüten-Infektion gebildet

Die GABA-Konzentration während der Pflanzeninfektion wurde in Weizenblüten, die mit Konidien der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten sowie dem Wildtyp inokuliert wurden nach 5 be-

ziehungsweise 15 dpi bestimmt. Wasser-inokulierte Ähren dienten als Referenzkontrolle. Im Zuge der initialen Infektion (5 dpi) kommt es zu einem signifikanten Anstieg der GABA-Konzentration bei Infektion mit beiden Stämmen (Abbildung 29 A).

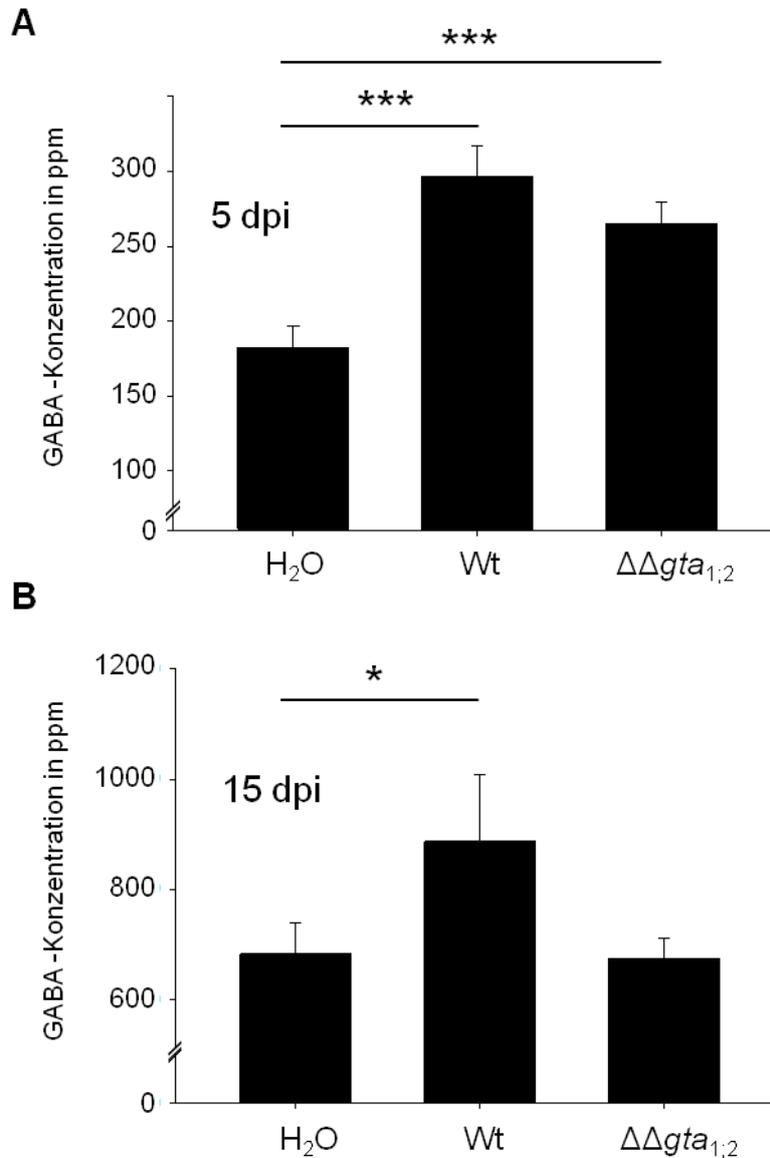


Abbildung 29 Bestimmung der GABA-Konzentrationen im Wildtyp und in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten. Die GABA-Konzentration wurde analysiert in infizierten Weizenähren nach 5 dpi (**A**) sowie 15 dpi (**B**). **A.** Während der frühen Infektion (5dpi) sind die GABA-Konzentrationen gegenüber den uninokulierten Ähren sowohl bei der Infektion des Wildtyps als auch bei den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten signifikant ($p < 0,01$) erhöht. **B.** Während der späteren Infektion (15 dpi) ist die GABA-Konzentration in den Ähren die mit dem Wildtyp-Stamm infiziert wurden signifikant erhöht ($p < 0,01$). Die Konzentration in den Wasser inokulierten Proben sowie den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten infizierten Ähren ist nicht signifikant verschieden. Die Experimente **A** und **B** wurden mit zusammengeführten Proben aus jeweils 10 Ähren für jeweils 3 unabhängige $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten sowie dem Wildtyp durchgeführt. Die Signifikanz für die Experimente A und B wurde mittels eines Hom-Sidak Anova-Tests berechnet.

Im Vergleich zur Referenzkontrolle (182 ppm) steigt die gemessene Konzentration im Wildtyp um ca. 30 % an (297 ppm). Dieser Anstieg fällt geringfügig schwächer aus bei Infektion mit den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (265 ppm). Es kommt daher bei Infektion beider Stämme zu einem signifikanten Anstieg in der GABA-Konzentration.

Wird die GABA-Konzentration nach 15 dpi in der gesamten Ähre bestimmt, bleibt die Konzentration im Wildtyp weiterhin signifikant erhöht (Abbildung 29 B). Die Werte der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten liegen auf Höhe der wasserinokulierten Kontroll-Ähren. Auffällig ist dabei, dass 1. Gegenüber der Wasserkontrolle signifikant erhöhte GABA-Konzentrationen zu einem Zeitpunkt (5 dpi) auftreten, zu dem keine Unterschiede in der Virulenz beider Stämme zu beobachten sind (vgl. statische Auswertung der Virulenz) 2. die GABA-Bildung einbricht, wenn die Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten bereits reduziert ist (15 dpi). Die Bildung von GABA korreliert daher mit der Virulenz des jeweiligen Stammes. Höchstwahrscheinlich findet die Bildung von GABA von Pflanzen-seite aus statt.

3.24. Der GABA-Anstieg während der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten Infektion führt zu identischen Expressions-Änderungen wie bei der *in vitro* Induktion mit GABA

Während der Infektion der Weizenblüte kommt es 5 dpi zu einem Anstieg der Gene des GABA-shunts in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (Abbildung 30).

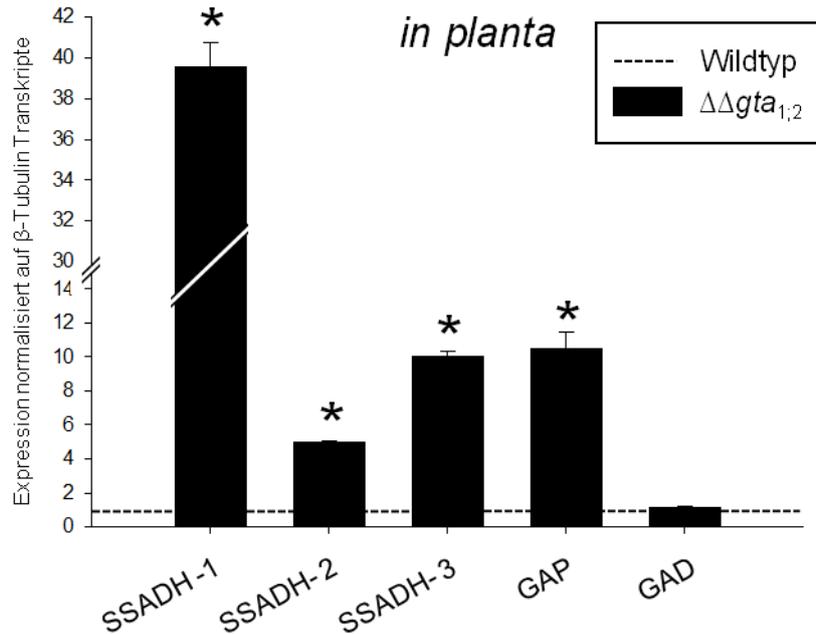


Abbildung 30 Expression der GABA-shunt-Gene *in planta*. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von drei potentiellen Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH 1-3), einer putativen GABA-Permease (GAP) sowie einer putativen Glutamat-Decarboxylase (GAD) bestimmt. Während der Weizenblüteninfektion (5 dpi) steigt die Expression aller Gene der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten mit Ausnahme der GAD signifikant gegenüber der Wildtyp-Expression an (Wt-Werte auf 1 gesetzt). Ein Stern stellt eine signifikante Veränderung nach dem Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test (Pfaffl *et al.* 2002) dar. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder.

Die Expression der SSADH-Gene ist stark erhöht (SSADH-1: $39,53 \pm 1,21$, SSADH-2: $4,95 \pm 0,13$, SSADH-3: $10,04 \pm 0,31$) ebenso wie die des Gens für die putative GABA-Permease (GAP: $10,5 \pm 0,99$). Die Glutamat-Decarboxylase (GAD)-Expression als Marker für die endogene pilzliche GABA-Produktion ist unverändert zwischen Wildtyp und $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten. Die starke Expression der SSADH-Gene sowie der putativen GAP wurde ebenfalls bei der *in-vitro*-Induktion mit GABA beobachtet (Abbildung 21). Die Reduktion der Virulenz während der Weizeninfektion könnte im Zusammenhang mit der Nutzung des gebildeten GABA stehen. Eine mögliche Ursache könnten GABA induzierte Veränderungen in den Genen der *T. aestivum*-ACC-Synthase (Aminocyclopropanecarboxylat-Synthase) sowie der *T. aestivum*-ACC-Oxidase sein. Beide Gene sind Schlüsselenzyme der Ethylen-Synthese und durch GABA induzierbar (Kathiresan *et al.* 1997). Aufgrund der häufig synergistisch auftretenden Regulation des Ethylen-Stoffwechsels mit der Jasmonat-Synthese (Lorenzo *et al.* 2003) könnte die Veränderung des Ethylen-Stoffwechsels zu einer erhöhten Resistenz führen. Die

Expression beider *T. aestivum*-Gene wurde in infizierten Weizenähren des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nach 5 dpi bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5 Regulation der Gene der Ethylen-Synthese (*T. aestivum*) sowie der *F. graminearum* Katalasen (5 dpi)

Gen	Absolute Regulation (im Vergleich zum Wildtyp)	Standardabweichung
ACC-Oxidase	1,03	0,19
ACC Synthase	-1,08	0,02
Katalase 1	1,23	0,06
Katalase 2.1	-1,11	0,04
Katalase 2.2	1,03	0,05
Katalase 3	-1,14	0,18

Es konnten keinerlei signifikante Veränderungen in der Expression festgestellt werden. Die reduzierte Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist daher kein Resultat einer veränderten Ethylen-Synthese von Pflanzenseite. Eine weitere Erklärung für die reduzierte Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist die erhöhte Anfälligkeit gegenüber H₂O₂ (Abbildung 18). Es wurde daher die Expression von 4-Katalasegenen, die mit der ROS-Sensitivität in Verbindung stehen (Ngyuen *et al.* 2012), untersucht. Es wurden ebenfalls keinerlei signifikante Expressionsänderungen zwischen den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten und dem Wildtyp beobachtet.

3.25. Die Unterbrechung des GABA-Metabolismus führt zu einer verringerten Expression zweier TCA-Enzyme

Während der *F. graminearum*-Infektion kommt es zu einem Anstieg der GABA-Konzentration (Abbildung 29). Der Metabolismus von GABA führt zur Generierung von Succinat, das im TCA-Zyklus von der Succinat-Dehydrogenase (SD) zu Fumarat umgesetzt wird. Der Metabolismus von GABA könnte daher einen Einfluss auf die

Expression der SD haben. Aus diesem Grund wurde die Expression der SD in GABA-MM als auch während der Pflanzeninfektion (5 dpi) untersucht.

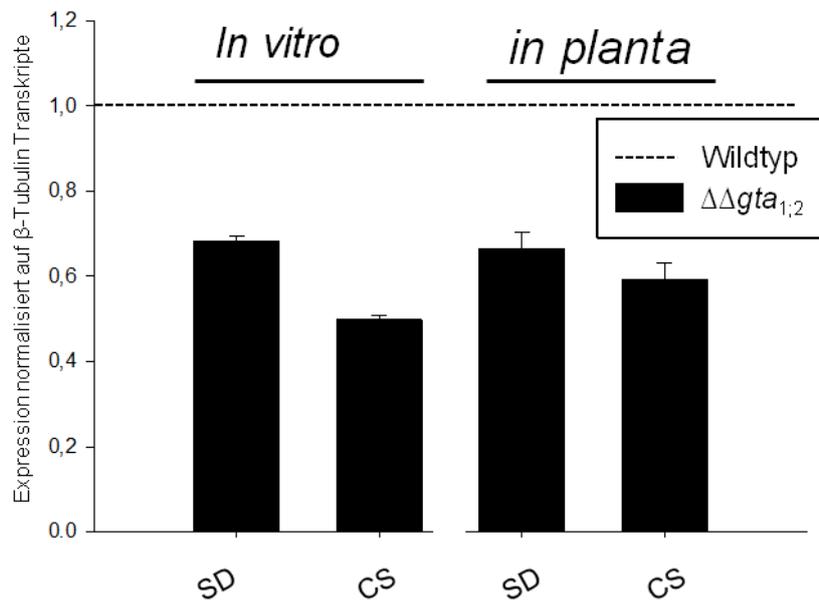


Abbildung 31 Expression TCA-Enzyme unter *in-vitro*- und *in-planta*-Bedingungen. Mittels qRT-PCR wurde die Expression einer putativen Succinat-Dehydrogenase (SD) sowie einer putativen Citrat-Synthase (CS) bestimmt. In GABA-MM sinkt die Expression der beiden Enzyme *in vitro* in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten sowohl als auch *in planta* (5 dpi) ab. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Als weiteres Gen wurde die Expression der Citrat-Synthase (CS) untersucht. Die Citrat-Synthase katalysiert im TCA-Zyklus an zentraler Stelle die Generierung von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat. Sowohl die CS-als auch die SD-Expression ist in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten *in vitro* gegenüber dem Wildtyp verringert (Abbildung 31). Eine gleiche Tendenz konnte 5 dpi während der Weizenblüteninfektion der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten beobachtet werden. Die verringerte Expression beider Gene deutet darauf hin, dass der mangelnde GABA-Metabolismus in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten einen Einfluss auf die Aktivität des TCA-Zyklus hat.

3.26. Die Energieproduktion der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten ist bei GABA-Zugabe stark verringert

Die verringerte Expression der SD sowie der CS legt den Schluss nahe, dass die Energiebereitstellung in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten verringert ist. Die SD ist ein Enzym

des TCA-Zyklus und ebenfalls indirekt an der ATP-Generierung in den Mitochondrien beteiligt (Komplex II). Die verringerte Expression der SD nach GABA Zugabe in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten könnte daher ebenfalls eine Auswirkung auf die Aktivität des Membranpotenzials haben.

Zu diesem Zweck wurde der Potentialfluoreszenzfarbstoff Rhodamin123 eingesetzt. Dieser fluoresziert in Abhängigkeit des Membranpotentials in den Mitochondrien und ermöglicht damit eine qualitative und quantitative Auswertung der Energiebereitstellung (Hickey *et al.* 2005). Initial führt die Aufnahme von Rhodamin123 dabei zu einem Anstieg der Fluoreszenz während eine intrazelluläre Akkumulation zu einem Quenching-Effekt führt (Baracca *et al.* 2003). Die Korrelation zwischen der Rhodamin123 Fluoreszenz und dem Membranpotential ist daher nur in einem limitierten physiologischen Bereich linear (Huang *et al.* 2007). Während die Zugabe von GABA im Wildtypen zu einer intensiven Fluoreszenz-Emission führt, war die emittierte Fluoreszenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten stark verringert (Abbildung 32 A).

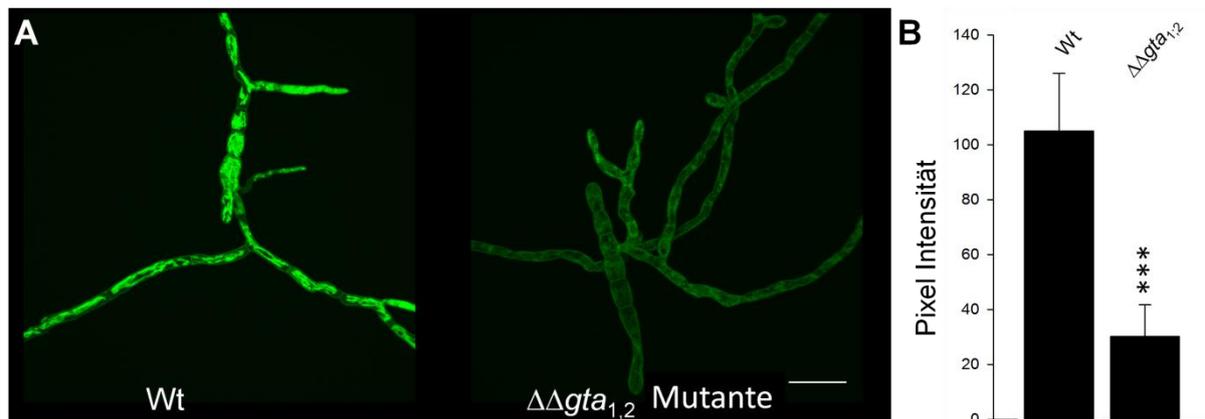


Abbildung 32 Analyse der mitochondrialen Energieproduktion mittels Rhodamin123. **A.** Mikroskopische Analyse der mitochondrialen Energieproduktion. Im Wildtyp-Stamm zeigt sich eine starke Fluoreszenz, im Gegensatz zu einer weitaus schwächeren Fluoreszenz in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten. Längenmaßstab: 20 μm . **B.** Statistische Auswertung der detektierten Rhodamin123 Fluoreszenz. Die Differenz der emittierten Fluoreszenz zwischen dem Wildtyp sowie den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wurde in 8 Bildern statistisch ausgewertet. Die Intensität wurde in fünf gleichgroßen Regionen in jedem Bild miteinander verglichen. Die Fluoreszenz in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist stark signifikant verringert verglichen zum Wildtyp. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Die Signifikanz wurde mittels Student's t-Test berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte anhand von jeweils 8 unabhängigen Aufnahmen des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten. Dies könnte auf eine gestörten Aufbau des mitochondrialen Membranpotentials in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten hindeuten.

3.27. Die GABA-Zugabe führt zu einem Einbruch der mitochondrialen Atmung in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten

Die Komplexe I, III und IV der mitochondrialen Atmungskette pumpen Protonen aus der Matrix des Mitochondriums in den Intermembranraum. Der erzeugte Potentialgradient ist die treibende Kraft bei der Generierung von ATP im Komplex V der Atmungskette. Da ein unterbrochener GABA-Metabolismus in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten zu einem stark verringerten Energieproduktion führt, sollte in einem weiteren Experiment die mitochondriale Atmung bestimmt werden. Die Sauerstoffaufnahme (Oxygen consumption rate, OCR) ist dabei ein Maß für die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser im Komplex IV und damit ein Marker der mitochondrialen Atmung. Die mitochondriale Atmung wurde zuerst in einem NaNO_3 -Minimalmedium überprüft (Abbildung 33).

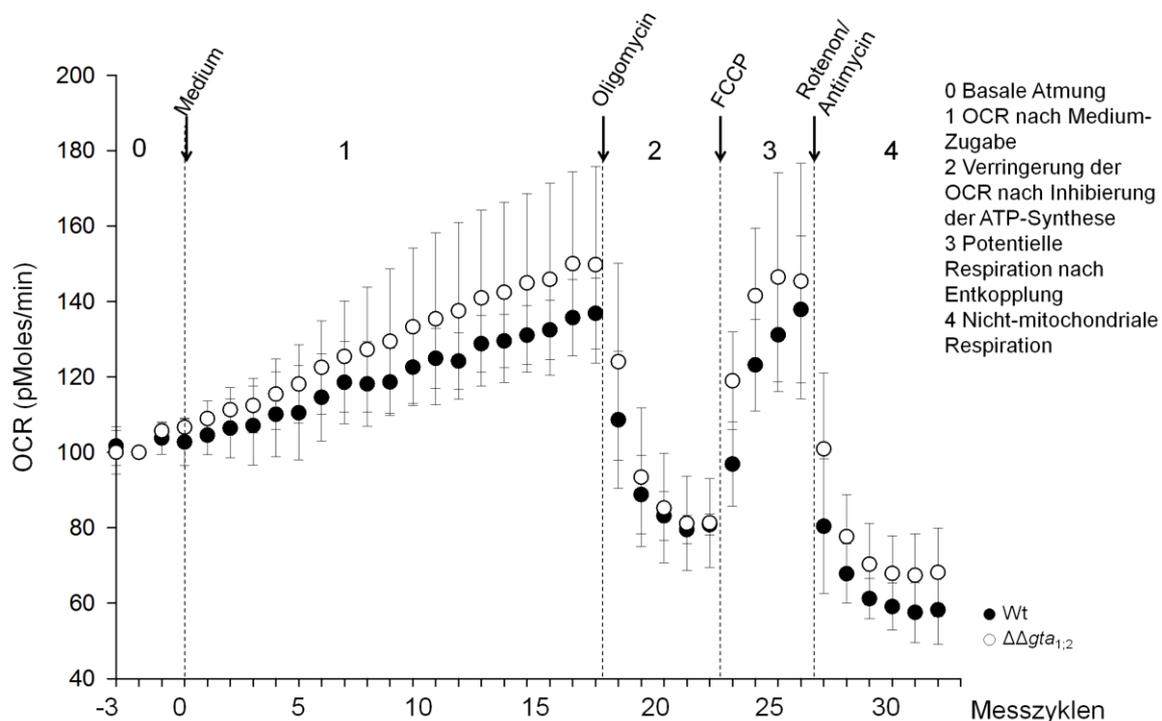


Abbildung 33 Untersuchung der Sauerstoffaufnahme (OCR) unter Kontrollbedingungen. Konidien des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wurde in einem Minimalmedium mit NaNO_3 für 24 h angezogen. Nach Zugabe von frischem Medium stieg die OCR beider Stämme im zeitlichen Verlauf an. Nach Zugabe von Oligomycin (ATP-Synthase-Inhibitor) fällt die OCR im Wildtyp sowie in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ab. Nach Zugabe des Protonophors FCCP (Carbonyl-cyanid-p-

trifluoromethoxyphenylhydrazon) steigt die OCR bei beiden Stämmen wieder an. Die maximale Respiration nach Zugabe von FCCP ist nicht signifikant verschieden. Die Zugabe von Rotenton und Antimycin führt zu einem starken OCR-Abfall in beiden Stämmen. Die gemessene Sauerstoffaufnahme beruht nach Zugabe von Rotenton und Antimycin auf nicht-mitochondrial bedingten Oxygenase-Reaktionen. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 biologischen Replikaten präsentiert.

Konidien des Wildtyps und der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wurden 24 Stunden in einem MM-Flüssigmedium mit NaNO_3 angezogen. Jede 7,32 Minuten (1 Messpunkt) wurde die Sauerstoffkonzentration im Medium gemessen. Ab dem Messpunkt 0 wurde neues MM- NaNO_3 hinzugegeben. In der Folge kam es von den Messpunkten 0-18 zu einem Anstieg der Sauerstoffaufnahme. Nach dem Messpunkt 18 wurde Oligomycin als Inhibitor der ATP-Synthase hinzugegeben, was zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Atmung führte. Anschließend wurde nach dem Messpunkt 23 Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) als Entkoppler der Atmungskette hinzugegeben. Die Aufhebung des Potentialgradienten führt dabei zu einem OCR-Anstieg in beiden Stämmen. Anschließend wurde nach dem Messpunkt 27 Rotenton und Antimycin (Komplex I- bzw. Komplex III- Inhibitor) hinzugegeben. Die OCR Messwerte sanken in der Folge in beiden Stämmen stark ab. Die Hemmung oder Entkopplung der Komplexe der Atmungskette führen dabei zu identischen Reaktionen in den Mitochondrien beider Stämme. Die mitochondriale Atmung der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist daher unter Kontrollbedingungen nicht signifikant verändert gegenüber dem Wildtyp.

In einem zweiten Experiment wurde die mitochondriale Atmung nach Zugabe von GABA (Messpunkt 0) bestimmt (Abbildung 34). Im Wildtyp führt die Zugabe von GABA ab dem Messpunkt 0 zu einem Anstieg der Sauerstoffaufnahme um 40 % über die initial gemessenen Werten (ohne GABA). Im Gegensatz dazu sinkt die OCR in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nach GABA-Zugabe auf 70 % der initial gemessenen Werte (Messpunkt 18) ab. Die Zugabe von Oligomycin nach dem 19. Messpunkt führt zu einem OCR-Abfall im Wildtyp, während die Reduktion in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten weit- aus schwächer ausfällt. Die Zugabe von FCCP nach dem 23. Messpunkt führte in beiden Stämmen zu einem OCR-Anstieg. Die Sauerstoffaufnahme der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten liegt dabei im Mittel unter den Werten des Wildtyps, was auf eine Verknappung von Succinat hindeutet. Dies korreliert mit der verringerten Expression der SD in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten, die wahrscheinlich durch Succinat-Mangel verursacht wird.

Ergebnisse

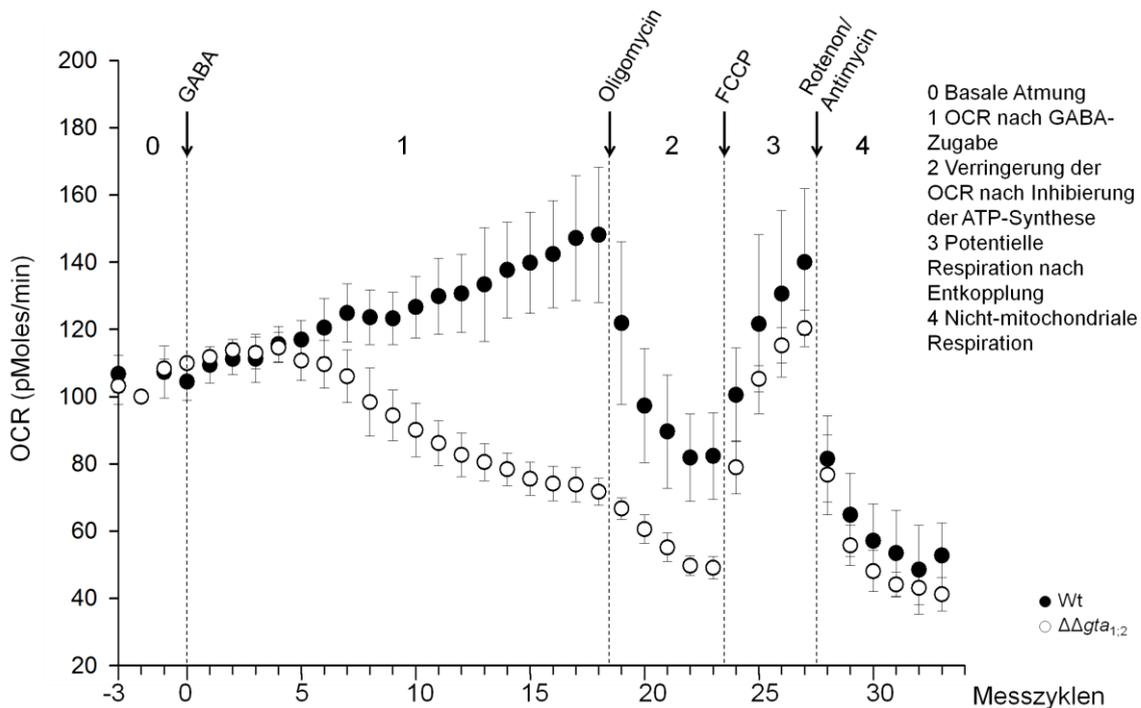


Abbildung 34 Untersuchung der Sauerstoffaufnahme (OCR) bei Zugabe von GABA. Konidien des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten wurden in einem Minimalmedium mit NaNO_3 für 24 h angezogen. Nach Zugabe von GABA stiegen die OCR-Werte des Wildtyps, während die OCR der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutante im zeitlichen Verlauf stetig weiter abfiel. Nach Zugabe von Oligomycin (ATP-Synthase Inhibitor) fällt die OCR des Wildtyps stark ab, während die Auswirkungen in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten geringer sind. Der OCR-Anteil, der in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten zur Deckung der ATP-Synthase eingesetzt wird, ist signifikant geringer als im Wildtyp. Der Abfall der OCR in beiden Stämmen wurde durch die Zugabe von FCCP (Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) als Protonophor der Atmungskette aufgehoben. Die maximale Respiration nach FCCP-Zugabe ist nicht signifikant verändert zwischen beiden Stämmen. Nach Zugabe von Rotenon und Antimycin sinkt die OCR in beiden Stämmen ab. Die gemessene Sauerstoffaufnahme beruht nach Zugabe von Rotenon und Antimycin auf nicht-mitochondrial bedingten Oxygenase-Reaktionen. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 biologischen Replikaten präsentiert. Alle Änderungen in der OCR zwischen Wildtyp und $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten zwischen den Messpunkten 8-23 sind statistisch signifikant verschieden (Student's t-Test, $p < 0,05$)

Die Zugabe von Rotenon und Antimycin nach Messpunkt 27 bewirkt eine komplette Repression der Sauerstoffaufnahme in beiden Stämmen. Die mitochondriale ATP-Generierung der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten ist unter Bedingungen ohne GABA uneingeschränkt leistungsfähig. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von GABA zu einem Abfall in der mitochondrialen Atmung der $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten.

4. Diskussion

Fusarium graminearum infiziert die Blüte und wächst über die Karyopse durch den Boden der Weizenblüte. Trichothecendefiziente Stämme können diese Geweberegion, den Rachisknoten, nicht durchdringen und infizieren nur die inokulierte Blüte (Proctor *et al.* 1995, Maier *et al.* 2005). Der Rachisknoten ist damit essenziell für den Aufbau einer Typ II Resistenz gegen eine *Fusarium* Infektion nach den Kriterien von Schröder und Christensen (1963) sowie Mesterhazy (1995). Während des invasiven Wachstums von der infizierten Blüte zum Leitgewebesystem der Ähre kommt es im Bereich des Rachisknotens zu einer Induktion der Trichothecen-Biosynthese (Ilgen *et al.* 2009). Dem Rachisknoten kommt damit im Zuge der *F. graminearum* hauptsächlich zwei Rollen zu 1. Im Rachisknoten erfolgt die erste Weichenstellung für ein erfolgreiches Eindämmen der initialen Infektion, wenn essentielle Virulenzgene des Pilzes (*Tr5*, *Fgl1*) fehlen. 2. Beim Erreichen des Rachisknoten findet eine Induktion der Trichothecen-Biosynthese im *F. graminearum* Wildtyp statt, daher muss sich dieses Gewebe vom nachfolgenden Leitgewebe unterscheiden. Als Arbeitshypothese wurde formuliert, dass beide Prozesse zu Veränderungen in der Konzentration sowie der Zusammensetzung der dort detektierbaren Metabolite führen.

4.1. Charakteristische pilzliche Elicitoren

Unter den detektierten Metaboliten finde sich einige, die spezifisch von pilzlicher Seite aus gebildet werden. Detektiert wurden das pilzliche Membranlipid Ergosterol und als Abbauprodukt des pilzlichen Zellwand-Polymers Chitin, Chitobiose (Abbildung 9). Beide Metabolite steigen während der Infektion mit Wildtyp-Stammes an. Bei der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm konnten sowohl Ergosterol als auch Chitobiose nicht detektiert werden (Abbildung 10). Die absoluten Mengen von Pilzmyzel, die mittels q-PCR detektiert werden konnten, sind bei der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm (Abbildung 6) weitaus geringer als bei der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm. Aus diesem Grund liegen wahrscheinlich sowohl Ergosterol als auch Chitobiose unter dem Detektionslimit der Metabolitenanalyse.

Der Anstieg von Chitobiose während der Wildtyp-Infektion deutet auf Abbauprozesse von Chitin während der Infektion hin. Chitobiose entsteht durch die hydrolytische Spaltung von Chitin durch Chitinasen. Der Konzentrationsanstieg von Chitobiose könnte daher auf eine vermehrte Bildung von Chitinasen zurückzuführen sein, wie sie bei der *T. aestivum* Infektion mit *F. graminearum* bereits beschrieben wurden (Pritsch *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2006). Ergosterol und Chitobiose sind typisch für eine pilzliche Infektion und können als Elicitoren von pflanzlichen Verteidigungsreaktionen fungieren. Oligosaccharide des Chitin-Abbaus können z. B. durch Bindung an CEBiP-Rezeptoren Verteidigungsreaktionen initiierten (zusammengefasst durch Wan *et al.* 2008). Ergosterol als charakteristisches Sterol-Lipid der pilzlichen Membran kann ebenfalls als ein genereller Elicitor fungieren und die Freisetzung von H₂O₂ induzieren (Mishra *et al.* 2012). Diese pilzlichen Pathogen assoziierten molekularen Muster (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPS) führen u. a. zur Einleitung der Hypersensitivitätsreaktion (HR). Diese beruht u. a. auf der massiven Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS).

4.2. Polyamin vermittelte Stressreaktionen während der Infektion

Während der Wildtyp-Infektion des Rachisknotens wurden erhöhte Mengen der Polyamine Putrescin und Agmatin sowie Spermidinsäure und GABA detektiert. Polyamine und GABA werden häufig bei abiotischen und biotischen Stresszuständen gebildet und können als Marker für die Stressperzeption herangezogen werden (Walters 2003, Kinnersly und Turano 2012). Während der Infektion des $\Delta tr5$ -Stamms kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Agmatin-Konzentration. Während Polyamine, wie Putrescin, nur bei der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm erhöht vorliegen, kommt es sowohl im Wildtyp- als auch im $\Delta tr5$ -infizierten Gewebe zu einer vermehrten Bildung von Hydroxymizsäure-Amiden (Hydroxycinnamic acid amides, HCAAs) wie Caffeoylputrescin (und deren Derivate).

Während der Weizenblüten-Infektion von *F. graminearum* findet durch Induktion der Ornithin-Decarboxylase und der Arginin-Decarboxylase die Bildung von Putrescin, Spermidin sowie Cadaverin statt (Gardiner *et al.* 2011). Die gebildeten Polyamine bilden Amide mit Hydroxymizsäuren, welche sich im Zuge der Infektion sehr stark akkumulieren (Gunnaiah *et al.* 2012). Die Bildung von HCAAs kann daher als eine pathogen induzierte Pflanzenverteidigung beschrieben werden.

Wird in *A. thaliana* die Agmatin-Coumaroyltransferase ausgeschaltet, unterbleibt die HCAA-Bildung und es kommt zu einer verringerten Resistenz gegenüber *A. brassicicola* (Muroi *et al.* 2009). Die erhöhte Konzentration von Caffeoylputrescin kann daher bei der Infektion von beiden Stämmen in Verbindung mit der Pflanzenverteidigung stehen. Die erhöhte Konzentration von Putrescin während der Wildtyp-Infektion, nicht jedoch bei der $\Delta tr15$ -Infektion, deutet daraufhin, dass das Stresslevel bei der Wildtyp-Infektion über dem der $\Delta tr15$ -Infektion liegt. Polyamine werden durch Polyamin-Oxidasen unter H_2O_2 Freisetzung abgebaut. Wird in *Nicotiana tabacum* die Expression einer Polyamin-Oxidase herunterreguliert, unterbleibt die H_2O_2 -Freisetzung während einer Elicitor vermittelten Apoptose (Yoda *et al.* 2006). Der Anstieg der Polyamin während der Infektion des Wildtyp-Stammes könnte daher in Verbindung mit einer vermehrten H_2O_2 -Freisetzung stehen.

4.3. Veränderungen in der Polyol-Konzentration und der Redox-Balance

Während der Infektion kommt es bei vielen Polyolen zu starken Konzentrationserhöhungen. In *F. graminearum* werden *in vitro* nach Salzstress vor allem die Polyole Arabitol, Glycerol und Mannitol gebildet (Zheng *et al.* 2012). Die Bildung von Polyolen von Pilzseite kann daher zur Kontrolle der Osmolarität erfolgen. Mannitol sowie Glycerol liegen auch bei der Infektion von *Helianthus annuus* durch *Sclerotinia sclerotiorum* erhöht vor, wobei Glycerol *in vitro* nach Salzstress als osmotisch ausgleichende Substanz gebildet wird (Jobic *et al.* 2007). Für die Virulenz von *F. graminearum* auf Weizen und Mais ist die Hyperosmolaritätskinase FgOS-2 entscheidend. FgOS-2 ist an zentraler Stelle im Stoffwechsel sowohl an der Kontrolle der Osmolarität als auch an der Redox-Balance beteiligt (Ngyuen *et al.* 2012). Mannitol z. B. wird bei filamentösen Pilzen aktuell häufig nicht nur als Osmolyticum, sondern auch als Metabolit der Redoxbalance diskutiert (zusammengefasst durch Solomon *et al.* 2007). Die Redoxkontrolle kann daher auch von osmolytisch aktiven Substanzen übernommen werden kann. Bei der Infektion des $\Delta tr15$ -Stamm kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Mannitol-Anstieg. *Triticum aestivum* kann kein Mannitol synthetisieren (Abebe *et al.* 2003), sodass der gemessene Konzentrationsanstieg auf eine vermehrte pilzliche Produktion zurückzuführen sein muss. Das pflanzliche Gewebe wird von der $\Delta tr15$ -Mutante weitaus schwächer kolonisiert als vom Wildtypen (Abbildung 6). Die vermehrte Detektion von Mannitol während der $\Delta tr15$ -Infektion könnte darauf hindeuten,

dass dieses in sehr hohen Mengen gebildet wird. Vorstellbar wäre auch eine Sekretion von Mannitol von Pilzseite, die zu einer Akkumulation im Rachisknoten führt.

Die Sekretion von Mannitol wird für den phytopathogenen Ascomyzeten *Alternaria alternata* nach Kontakt mit Gewebeextrakt von *Nicotiana tabacum* beschrieben. Es kommt dabei zur Bildung eines Mannitol abbauenden Enzyms von *N. tabacum*, obwohl Mannitol von Pflanzenseite nicht synthetisiert werden kann. Diskutiert wird daher, dass Mannitol an der Unterdrückung der pflanzlichen ROS-Antwort beteiligt ist und die Pflanze dieser Suppression aktiv entgegenwirkt (Jennings *et al.* 1998, 2002).

4.4. Die Redoxbalance ist gestört während der Infektion des Wildtyp-Stamms

Während der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm steigt die Konzentration der Polyol-Verbindung Galactinol und des Dreifachzucker Raffinose an. Galactinol ist das Substrat für die Raffinose-Synthase, welche u. a. durch ROS induziert wird. Erhöhte Konzentrationen beider Metabolite führen zu einer verringerten Anfälligkeit von transgenen *A. thaliana* Pflanzen gegenüber ROS-Einwirkung (Nishizawa *et al.* 2008). Der Anstieg von Raffinose und Galactinol während der $\Delta tr5$ -Infektion könnte damit auf eine verbesserte Redoxbalance hindeuten.

Ein wichtiger ROS-detoxifizierender Metabolit ist Glutathion. Das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem Glutathion kann zur Beurteilung des oxidativen Stresszustandes herangezogen werden. Während der Wildtyp-Infektion steigt der Anteil des oxidierten Glutathions im Verhältnis zum nicht-oxidierten Glutathion auf 131 % an. Im Gegensatz dazu geht der Verhältniswert zwischen oxidiertem zu nicht-oxidiertem Glutathion während der $\Delta tr5$ -Infektion auf 78 % zurück. Die Differenz der Regulation gibt damit Aufschluss über die ROS-Homöostase im Gewebe. Im Wildtyp-infizierten Gewebe kommt es dabei zu einer erhöhten ROS-Einwirkung, was zu einer vermehrten Bildung von oxidiertem Glutathion führt. Glutathion und Ascorbat sind zusammen im Glutathion-Ascorbat-Zyklus an der ROS-Detoxifizierung beteiligt.

Dehydroascorbat als oxidierte Form der Ascorbinsäure ist daher ein wichtiger Metabolit dieses Kreislaufs. Die Regeneration von Ascorbat findet durch eine Dehydroascorbat-Reduktase im Glutathion-Ascorbat-Zyklus statt. Dabei reagiert Glutathion mit Dehydroascorbat zu oxidiertem Glutathion sowie Ascorbat. Die Konzentration von Dehydroascorbat fällt während der Infektion mit dem Wildtyp signifikant ab. Der Abfall

von Dehydroascorbat zusammen mit dem Anstieg von oxidiertem Glutathion könnte ein Hinweis auf eine vermehrte Aktivität der Dehydroascorbat-Reduktase sein. Während der *F. graminearum*-Infektion auf *T. aestivum* kommt es zu einer Akkumulation einer Dehydroascorbat-Reduktase, was eine vermehrte ROS-Detoxifizierung durch den Glutathion-Ascorbat-Zyklus nahelegt (Zhou *et al.* 2005).

Ebenfalls ein stark antioxidativ wirkender Metabolit ist α -Tocopherol (Vitamin E) (Sergi 2005). Die Oxidationsprodukte von α -Tocopherol (Quinon-Verbindungen) werden nicht, analog zur Situation von Ascorbat, recycelt. Daher führt anhaltender ROS-Stress zu einem Absinken des α -Tocopherol Levels (Munné-Bosch 2005). Der Abfall im Wildtyp zusammen mit dem Anstieg während der $\Delta tr5$ -Infektion sind weitere Indizien, dass während der Wildtyp-Infektion die ROS-Detoxifizierung gestört ist.

Durch die Einwirkung von ROS kommt es zur Entstehung von Peroxylipiden sowie Oxidationsprodukten der Nukleinsäuren. Beispiele dafür sind u. a. die während der Wildtyp-Infektion erhöhte Konzentration von 16-Hydroperoxy-9Z,12,14E-Octadecatriensäure als Metabolit für die Peroxidation von Lipiden sowie Hydroxymethyluracil als Indikator für die Oxidation von Nukleinsäuren (Cooke *et al.* 2003).

4.5. Während der Wildtyp-Infektion finden apoptotische Prozesse statt

Der Rachisknoten ist eine höchst induktive Zone der DON-Synthese (Ilgen *et al.* 2009). Der Abfall von ROS-detoxifizierenden Metaboliten mit der zeitgleichen Akkumulation von ROS-geschädigten Metaboliten (z.B. Peroxylipide und oxidierte Nukleinsäuren) während der Wildtyp-Infektion deutet auf einen Zusammenhang zwischen einer funktionierenden DON-Synthese (Wildtyp) und dem Auftreten von ROS-Schäden hin. Die Aufnahme von DON durch *T. aestivum* führt dabei zur Freisetzung von H_2O_2 (Desmond *et al.* 2008). Die oxidativen Stressschäden während der Wildtyp-Infektion könnten daher auf die Wirkung von DON zurückzuführen sein.

Die Aufnahme von DON hat die Einleitung apoptotischer Prozesse sowohl in Säugerzellen als auch in Pflanzenzellen zur Folge (Rocha *et al.* 2005, Desmond *et al.* 2008). Diesem Modell folgend, müssten vermehrt Metabolite für apoptotische Prozesse im Wildtyp-infizierten Gewebe zu finden sein.

Die Apoptose der Zellen während der HR ist wirksam bei der Abwehr von biotrophen Erregern, begünstigt aber das Wachstum von nekrotrophen Pilzen (Dickman und Figueiredo 2013). Ein möglicher Indikator der Apoptose ist der Konzentrations-Anstieg

von Dihydroceramid während der Wildtyp-Infektion. Während der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm kommt es nicht zu signifikanten Veränderungen.

Die Wirkung mancher Mykotoxine beruht auf Wechselwirkungen mit dem Spinghiolipidmetabolismus des Wirtes. Während der Infektion von *Lycopersicon esculentum* z. B. wird von *Alternaria alternata f.sp. lycopersici* das AAL-Toxin (Alternariol) gebildet (Gilchrist und Grogran 1976). Die Wirkung von Alternariol, sowie dem strukturell ähnlichen Fumonisin B1, beruht auf der Hemmung einer Acetyl-CoA-abhängigen Ceramid-Synthase und führt damit zur Apoptose (Gilchrist 1997). Beide Mykotoxine sind strukturell ähnlich zum Spinghanin und beeinflussen über die Ceramid-Synthase wahrscheinlich die Signaltransduktion, welche zur Apoptose führt. Untersuchungen in *A. thaliana* konnten zeigen, dass sowohl Ceramid C2 als auch Dihydroceramid C2 die Apoptose auslösen können (Liang *et al.* 2003). Der detektierte Anstieg von Dihydroceramid im Wildtyp-infizierten Gewebe lässt daher auf apoptotische Prozesse während der Infektion schließen. Im Rachisknoten der mit dem $\Delta tr5$ -Stamm infizierten Ähren lassen sich keine Änderungen in der Dihydroceramid-Konzentration ausmachen. Der Anstieg von Dihydroceramid geht daher wahrscheinlich auf die apoptotische Wirkung von Deoxynivalenol zurück.

4.6. Die Infektion des Wildtyps führt zu einem Absinken der Aminosäure-Konzentration

In höheren Pflanzen wird anorganischer Stickstoff durch die Aminosäuren Glutamin, Glutamat, Asparaginsäure sowie Aspartat assimiliert (Lam *et al.* 1996). Mit Ausnahme von Glutamat (nicht signifikant reguliert) fallen die Konzentrationen aller genannten Aminosäuren während der Wildtyp-Infektion signifikant ab (Abbildung 9). Der Abfall dieser vier Aminosäuren während der Wildtyp-Infektion deutet auf eine Verknappung der Stickstoffquellen und einer Zuführung zum Energiestoffwechsel hin. Dieser Stickstoffmangel ist weniger stark ausgeprägt während der $\Delta tr5$ -Infektion. Hier kommt es bei der *Tr5*-Infektion zu einem Anstieg von Glutamat und Aspartat.

Ein Anstieg der Metabolite N-Acetyl-L-Glutaminsäure, N2-Acetyl-Ornithin sowie Acetyl-L-Glutamat-5-Semialdehyd deutet daraufhin, dass Glutamin vermehrt in den Urea-Zyklus eingebracht wird. Aus dem Urea-Zyklus werden die Polyamine synthetisiert, sowie über einen Seitenzweig mit 4-Guanidinobutanoat als Intermediat, GABA. Der Anstieg von 4-Guanidinobutanoat sowie von Putrescin deutet auf einen vermehrten

Metabolitenfluss vom Urea-Zyklus zur Putrescin/GABA-Synthese hin. Im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe kommt es nicht zu einem Anstieg von N-Acetyl-L-Glutaminsäure sowie Acetyl-L-Glutamat-5-Semialdehyd. Zugleich kommt es nicht zu einer signifikanten Akkumulation von Putrescin und GABA. Wahrscheinlich wird Glutamin daher u. a. zur Synthese der Polyamine und GABA während der Wildtyp-Infektion eingesetzt. Da das generelle Stresslevel bei der $\Delta tr5$ -Infektion unter dem der Wildtyp-Infektion liegt, ist höchstwahrscheinlich der Bedarf von Urea-Metaboliten für die Polyamin-Synthese geringer. In der Folge wird während der $\Delta tr5$ -Infektion weniger Glutamat im Harnstoff-Zyklus abgebaut.

Kennzeichnend für die Infektion beider Stämme ist ein starker Anstieg der Metabolite der pflanzlichen Lysin-Synthese. Ein Indikator dafür ist der starke Anstieg von Dihydrodipicolinsäure, die ein essenzieller Aufbau-Metabolit des Diaminopimelat-Wegs (DAP) der Lysin-Synthese ist. Die Konzentration von Lysin wird während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm nicht signifikant verändert. Stattdessen steigt die Konzentration von α -Aminoadipat (AAA) als Abbau-Metabolit des Lysins an. Der Anstieg von AAA deutet auf einen Abbau von Lysin von Pflanzenseite durch den Saccharopin-Weg hin. Durch diesen Stoffwechselweg kommt es zur vermehrten Bildung von α -Aminoadipat, das über mehrere Intermediate in Form von Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus eingeht (Arruda *et al.* 2000). Gegen eine Einordnung von α -Aminoadipat als Indikator für eine vermehrte Lysin-Synthese von pilzlicher Seite spricht 1. die gleichbleibende Konzentration von Homo-Isocitrat, das einer der Vorläufer der Lysin-Synthese über α -Aminoadipat ist, und 2. der α -Aminoadipat-Anstieg im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe, in dem, wie oben geschildert, keine pilzlichen Metabolite, wie z.B. Ergosterol, detektiert werden konnten.

Die Dihydrodipicolinsäure-Synthese unterliegt einer Endproduktregulation durch die Lysin-Konzentration (Arruda *et al.* 2000). Wird vermehrt Lysin über den Saccharopin-Weg abgebaut (AAA Anstieg), entfällt die Endprodukthemmung der Dihydrodipicolinsäure-Synthase. In der Folge kommt es zu einer vermehrten Bildung von Dihydrodipicolinsäure. Die Auf- und Abbauprozesse des Lysins finden simultan statt. Die Lysin-Konzentration ist in der Folge während der Infektion des Wildtyps nicht signifikant verändert.

Der Katabolismus der Aminosäuren deutet auf einen vermehrten Bedarf an Acetyl-CoA während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm hin. Weitere Anzeichen für eine vermehrte Acetyl-CoA-Bereitstellung finden sich im Metabolismus der Butanoate.

4.7. Veränderungen im Fettsäureprofil sowie im Butanoat-Metabolismus während der Wildtyp-Infektion

Der Abbau von Fettsäuren sowie von Butanoaten führt zur Bildung von Acetyl-CoA, das in den TCA-Zyklus eingebracht wird. Während der Wildtyp-Infektion kommt es zur Bildung von Aceto-Acetat sowie von 4-Hydroxybutansäure (GHB). Die Akkumulation von Aceto-Acetat deutet auf einen vermehrten Metabolismus der Butanoate hin, was die Bildung von Acetyl-CoA zur Folge hat. Der Anstieg von GHB könnte auf einem Seitenzweig des GABA-Stoffwechsels beruhen. In *A. thaliana* ist eine Succinat-Semialdehyd-Reduktase beschrieben, die im heterologen *S. cerevisiae*-System die Bildung von GHB aus Succinat-Semialdehyd katalysiert (Breitkreuz *et al.* 2003). Während der Wildtyp-Infektion kommt es zu starken Veränderungen im Fettsäureprofil. Die Akkumulation fast aller Fettsäuren (34 von 39) während der Wildtyp-Infektion, nicht jedoch bei Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm, deutet auf eine vermehrte Lipid-Nutzung hin. Aufgrund der Funktion von Triglyceriden als Fettspeicher im Weizenkorn (Tavener und Laidman 1971) ist eine Metabolisierung analog zum Amylopectin vorstellbar. Die Freisetzung dieser Fettsäuren kann ein distinktes Merkmal der späten nekrotrophen Phase darstellen, die die $\Delta tr5$ -Mutante nicht erreicht.

Der Glycerolipidmetabolismus ist wichtig für die pilzliche Virulenz. Störungen in lipolytischen Enzymen führen u. a. in *Colletotrichum lagenarium*, *Magnaporthe oryza* sowie in *F. graminearum* zu einer drastischen Reduktion der Virulenz (Kimura *et al.* 2001, Wang *et al.* 2007, Voigt *et al.* 2005). Der Anstieg der Fettsäuren könnte auch von Pilzseite durch vermehrte lipolytische Prozesse während der frühen Pflanzeninfektion verursacht werden (Divon und Fluhr 2007). Eine Erklärung, warum die Freisetzung von Fettsäuren im Zusammenhang mit einer erfolgreichen *F. graminearum*-Infektion stehen liefern Untersuchungen zur sekretierten *F.-graminearum* Lipase FGL1 (Blümke *et al.* 2014). Die Freisetzung von 18:3 Fettsäuren wie z. B. Linolensäure durch die FGL1 führt dabei zu einer Suppression einer pflanzlichen Callose-Synthese und in der Folge zur Etablierung einer erfolgreichen Infektion (Blümke *et al.* 2014). Interessanterweise ist die Konzentration von Linolensäure nur während der Wildtyp-Infektion signifikant erhöht, nicht jedoch während der $\Delta tr5$ -Infektion. Die Zellwandverdickungen während der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm (Jansen *et al.* 2005) können daher möglicherweise auch auf eine vermehrte Einlagerung von Callose zurückzuführen sein, die nicht durch die Freisetzung von Fettsäuren reprimiert

wird. Dieses Beispiel zeigt, dass dem Anstieg der Fettsäuren eine Funktion in der pilzlichen Virulenz zukommt, die über eine Rolle im primären Metabolismus weit hinausgeht.

Fettsäuren wie Eicosapentaensäure und Arachidonsäure sind bei der Infektion von *Phytophthora infestans* starke Elicitoren und führen zur Bildung von toxischen Sesquiterpenverbindungen (Bostock und Laine 1981). Möglicherweise sind einige der detektierten Fettsäuren auch als Elicitor bei der *F. graminearum*-Infektion wirksam. Über die Fettsäuren werden auch Signalmetabolite der Pflanzen-Verteidigung synthetisiert. Ein häufig wiederkehrendes Element in der Signaltransduktion bei der Infektion eines Phytopathogens sind dabei Jasmonat-Verbindungen aus der Gruppe der pentacyklischen Oxylipine.

4.8. Die Infektion des $\Delta tr5$ -Stamms führt zu einem Anstieg von Signalmetaboliten

Jasmonsäure ist in vielen Pflanzen der prioritäre Verteidigungsmechanismus gegen nekrotrophe Pilze, wohingegen die Bildung von Salicylsäure ein klassisches Element der Verteidigung gegenüber biotrophen Pilzen darstellt (Glazebrook 2005). Der Octadecanoidweg, der über verschiedene Linolensäuren zur Jasmonsäure führt, scheint während der $\Delta tr5$ -Infektion stärker aktiviert zu werden als während der Wildtyp-Infektion. Ein klassisches Beispiel für die Bedeutung der Jasmonat-Biosynthese für die Pflanzenverteidigung ist die *coi1*-Rezeptormutation in *A. thaliana*. In diesen Jasmonat-insensitiven Linien bricht die Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *A. brassicicola* ein, nicht jedoch gegenüber dem biotrophen Pathogen *Peronospora parasitica* (Thomma *et al.* 1998). In Übereinstimmung dazu scheint die FHB-Typ-II Resistenz des Weizenkultivars Sumai III auf einer Jasmonsäure vermittelten Verteidigung beruhen (Li und Yen 2008). Der Anstieg von Dihydrojasmonsäure wurde ebenfalls bei der *F. graminearum*-Infektion von *Hordeum vulgare* als putativer RR-Metabolit (Resistance-related) beschrieben (Kumaraswamy *et al.* 2011). Die erhöhte Konzentration von Dihydrojasmonsäure während der $\Delta tr5$ -Infektion könnte daher an der Ausbildung der Typ II-Resistenz im Rachisknoten beteiligt sein. Jasmonat-Verbindungen sowie Gibbereline stehen in einem antagonistischen System zueinander. Die Freisetzung von Gibberellinen führt dabei zu einer Unterdrückung der Jasmonat-Wirkung (Yang *et al.* 2012). Der starke Gibberelin-Anstieg während der Wild-

typ-Infektion könnte daher einen zusätzlich negativen Effekt auf die Jasmonat-Synthese haben.

Während der Wildtyp-Infektion steigt die Konzentration des Triterpenoids Ursolsäure stark an. Ursolsäure wirkt in Pflanzen wahrscheinlich als Inhibitor von Lipidoxygenasen (LOX) sowie Cyloxygenasen und hemmt damit die Jasmonat induzierte Pflanzenverteidigung (Wasternack *et al.* 1993). Die erhöhte Ursolsäure-Konzentration könnte im Wildtyp infizierten Gewebe die LOX-Enzyme des Octadecanoid-Stoffwechsels hemmen. In der Folge kommt es nicht mehr zu einem Anstieg der Jasmonat-Verbindungen. Analog zur Unterdrückung der Callose-Synthase durch Freisetzung von Fettsäuren (Blümke *et al.* 2014) könnte daher Ursolsäure eine supprimierende Wirkung auf die Enzyme des Octadecanoid-Stoffwechsels haben.

Es wäre möglich, dass sowohl Ursolsäure als auch die Gibbereline von *F. graminearum* während der Infektion gebildet werden. Für *F. graminearum* ist bislang kein GA-Synthese-Cluster nachgewiesen worden (Tudzynski 2005). Trotzdem befinden sich im *F. graminearum*-Genom 6 Gene, die Homologien zu Gibberellin-20-Oxidasen aufweisen. Es wäre möglich, dass nicht alle Gene des GA-Clusters in *F. graminearum* konserviert sind.

Neben Dihydrojasmonsäure steigt während der $\Delta tr5$ -Infektion die Riboflavin-Konzentration an. Die Behandlung von *A. thaliana* mit Riboflavin führt zu einer erhöhten Resistenz gegen die Infektion mit *Peronospora parasitica* sowie *P. syringae* (Dong und Beer 2000). Die von Riboflavin induzierten Verteidigungsreaktionen finden dabei unabhängig von Salicylsäure und Jasmonsäure statt und beruhen auf der Freisetzung von H_2O_2 sowie der Induktion von Genen der Pflanzenverteidigung durch den Rezeptor NPR1 (Zhang *et al.* 2009). Der Anstieg von Riboflavin könnte daher während der *F. graminearum*-Infektion ebenfalls in Verbindung mit der erhöhten Resistenz stehen. Ausgelöst durch Signalmetabolite der Verteidigung werden spezifische Verteidigungsreaktionen initiiert, wie zum Beispiel die Verstärkung der Zellwand durch Verbindungen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels.

4.9. Bei der Infektion mit dem Wildtyp und dem $\Delta tr15$ Stamm kommt es zu Veränderungen in Metaboliten der Zellwand

Durch die Infektion des Wildtyps sowie des $\Delta tr15$ -Stammes kommt es im Rachisknoten zu einem Konzentrationsanstieg von p-Coumarinsäure als Ausgangspunkt der Phenylpropanoid-Synthese (Abbildung 9, Abbildung 10). Die Akkumulation von p-Coumarinsäure wurde als putativer RR-Metabolit bei der *F. graminearum*-Infektion von *H. vulgare* (Bollina *et al.* 2011, Kumaraswamy *et al.* 2011) sowie von *T. aestivum* nachgewiesen (Gunnaiyah *et al.* 2012). Ausgehend von der p-Coumarinsäure werden über Zwischenwege die Lignine synthetisiert.

Ein Metabolit, der während der Infektion des Wildtyp-Stamms stark abfällt, ist Sinapylalkohol. Ausgehend vom Sinapylalkohol wird durch eine Sinapylalkohol-Dehydrogenase Sinapylaldehyd synthetisiert. Dieses ist der direkte Vorläufer der Syringyl-Lignine. Eine erhöhte Konzentration von Sinapylaldehyd während der *F. graminearum*-Infektion von Weizen wurde als putativer Resistenzmarker beschrieben (Gunnaiyah *et al.* 2012). Die Konzentration von Sinapylalkohol ist unverändert bei der Infektion mit dem $\Delta tr15$ -Stamm. Die Sinapyl-Alkohol-Dehydrogenase ist in *T. aestivum* sowohl durch Konidien von *Botrytis cinerea* als auch durch Chitosan-Zugabe induzierbar (Mitchell *et al.* 1994). Dies könnte den Schluss nahe legen, dass vermehrt Sinapylalkohol zu Sinapylaldehyd während der Infektion umgesetzt wird. Da es in der suszeptiblen Reaktion nicht zur Ausbildung eines Resistenzphänotyps kommt, könnte die Bildung von Sinapylalkohol auch durch die Wirkung von DON als Translationshemmer unterbrochen werden.

Eine weitere Verbindung, die aus dem Phenylpropanoid-Stoffwechsel synthetisiert wird, sind Lignane. Während der Infektion steigt im $\Delta tr15$ infizierten Gewebe die Konzentration des Lignans Deoxypodophyllotoxin an. Die erhöhte Konzentration von einem Derivat des natürlichen Lignans, Podophyllotoxin wurde bei der Infektion von resistenter Gerste mit *F. graminearum* beschrieben (Kumaraswamy *et al.* 2011). Podophyllotoxine werden häufig als Zytotoxine in der medizinischen Behandlung eingesetzt (Canel *et al.* 2000). Es wäre daher möglich, dass diese Lignane auch eine inhibierende Wirkung bei der *F. graminearum*-Infektion entfalten. Die Bildung von Lignanen ist induzierbar durch einen Zellwandextrakt von *F. graminearum* in *Linum album* und könnte daher eine Elicitor induzierbare Verteidigungsreaktion darzustellen (Tah-

sili *et al.* 2014). Der signifikante Anstieg im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe könnte daher in Zusammenhang mit der Pflanzenverteidigung stehen.

Neben den Metaboliten des Phenylpropanoid-Stoffwechsels wurde während der Wildtyp-Infektion auch ein Absinken der Konzentration von Cellobiose detektiert. Cellobiose entsteht als direkter Metabolit durch Einwirkung von Cellulasen auf Cellulose. Über Umwege kann aus Cellobiose wieder Cellulose synthetisiert werden. *F. graminearum* sekretiert eine hohe Anzahl von zellwandabbauenden Enzymen und ist enzymatisch in der Lage, die komplette Pflanzenzellwand zu verdauen (Phalip *et al.* 2005). Der Abfall von Cellobiose ist ein Indiz für vermehrte Katabolismus-Prozesse. Der zeitgleiche Anstieg der Glykolyse legt den Schluss nahe, dass die Zellwand zur Deckung des Energiebedarfs abgebaut wird.

Der Anstieg von Xylose als Degradationsmetabolit der Xylan-haltigen Hemicellulosen ist ebenfalls ein unterstützendes Indiz für einen vermehrten Katabolismus der pflanzlichen Zellwand, der in glykolytische Prozesse mündet.

4.10. Metabolisierung der Speichersubstanzen

Während der Infektion beider Stämme kommt es zu einem sehr starken Anstieg von Farnesal als Metabolit der Sesquiterpen-Synthese. Da im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe keine charakteristischen pilzspezifischen Metabolite wie Ergosterol und Chitobiose detektiert werden konnten, findet die vermehrte Synthese von Farnesal von Pflanzenseite aus statt. Möglicherweise wird über die Sesquiterpen-Synthese vermehrt Geranyl-Geranyl-Di-Phosphat als Vorläufer für die Gibberelinsäuren synthetisiert. Alle Gibberelinsäuren werden nur während der Infektion gebildet und sind nicht detektierbar in den Wasserkontrollen. Der Farnesal-Anstieg während der Infektion könnte daher ein Indikator für eine vermehrte Gibberelinsäuren-Synthese ausgehend von dem Sesquiterpen-Stoffwechsel darstellen.

Während der Infektion von *F. graminearum* kommt es im Weizengewebe zur Expression einer Kauren-Synthase, die an der Synthese der Gibbereline beteiligt ist (Kruger *et al.* 2002). Der gemessene Konzentrationsanstieg der Gibbereline beruht daher wahrscheinlich auf einer vermehrten Aktivität der GA-Synthese von Pflanzenseite.

Entwicklungsbiologisch induziert die Bildung von Gibberelinsäuren die vermehrte Synthese von α -Amylasen im Zuge der Samenkeimung (Varner *et al.* 1964). In der Folge kommt es zur Metabolisierung von Speicherstoffen durch die Freisetzung von

Stärke hydrolysierenden α -Amylasen aus dem Aleuron. Physiologisch könnte die Umwandlung von Stärke dazu dienen, die Pflanzenverteidigung mit zusätzlicher Energie zu versorgen, die nicht aus dem Primärstoffwechsel abgezogen werden muss.

Während der Wildtyp-Infektion kommt zu einem starken Anstieg von Amylopectin als Bestandteil der Stärke. Stärke besteht aus den Polysacchariden Amylose sowie Amylopectin. Die Konzentrationserhöhung des Amylopectins könnte daher darauf hindeuten, dass während der Wildtyp-Infektion vermehrt α -Amylasen gebildet werden. In der Folge kommt es zum Abbau der Amylose, während der Anteil von Amylopectin ansteigt. Die Konzentrationserhöhung des Amylopectins wäre nach diesem Modell, ein Ergebnis eines vermehrten Stärkemetabolismus.

Interessanterweise führt die Supplementation von hydrolysierten Spaltprodukten der Amylose, wie Amylopectin oder Dextrin zu Kulturen von *Fusarium verticillioides* zu einer vermehrten Bildung des Mykotoxins Fumonisin (Bluhm und Woloshuk 2005). In *F. graminearum* konnte in Kultur kein Einfluss von Amylopectin oder Amylose auf die DON-Synthese nachgewiesen werden (Jiao *et al.* 2008). Untersuchungen mit einem transgenen Reporterstamm konnten jedoch eine Induktion der Toxinsynthese während der Kolonisierung der stärkereichen Weizenkaryopse zeigen (Ilgen *et al.* 2009). Es wäre daher vorstellbar, dass der Metabolismus von Stärke, in Verbindung mit unbekanntem Faktoren, einen positiven Einfluss auf die DON-Synthese während der Pflanzeninfektion hat.

Neben dem Anstieg von Amylopectin fallen die Konzentrationen der freien Zuckerverbindungen, wie Glukose, Fruktose, Saccharose und Raffinose, während der Wildtyp-Infektion ab. Im $\Delta tr5$ infizierten Gewebe werden die Zuckerverbindungen entweder nicht signifikant reguliert (Glukose sowie Saccharose) oder steigen sogar signifikant an (Fruktose und Raffinose). Die negative Tendenz während der Wildtyp-Infektion deutet auf eine Umprogrammierung des Stoffwechsels zur Energiebereitstellung von Verteidigungsreaktionen hin (Bolton 2009). Zeitgleich kann es zu einer verstärkten Aufnahme der Zuckerverbindungen durch den Pilz kommen. Die vermehrte Expression von pilzlichen Zucker-Transportern ist für einige phytopathogene Pilze bereits beschrieben worden. Ein Anstieg der mRNA von Hexose-Transportern und ein genereller Rückgang der Zucker und Aminosäuren konnten z. B. bei der Infektion von *Helianthus annuus* durch *Sclerotinia sclerotiorum* beobachtet werden (Jobic *et al.* 2007). Für *F. graminearum* ist eine vermehrte Expression eines Hexose-

Transportproteins beschrieben worden (Kruger *et al.* 2002). Der Abfall der Zuckerverbindungen während der Infektion geht daher wahrscheinlich auf die Metabolisierung für Verteidigungsprozesse und eine aktive pilzliche Aufnahme zurück. Beide Prozesse finden im $\Delta tr5$ -infizierten Pflanzengewebe weitaus schwächer statt als während der Wildtyp-Infektion.

4.11. Zusammenfassung der metabolischen Veränderungen

Bei der Infektion des Wildtyps kommt es im Weizenrachisknoten zu einem Anstieg der Polyamine und GABA als Stressmetaboliten. Die Aktivierung des Sesquiterpenstoffwechsel führt zu einer vermehrten Synthese der Gibbereline, die möglicherweise α -Amylasen induzieren und hierdurch die Metabolisierung der Stärke einleiten. Speicherstoffe wie Stärke und Triacylglyceride werden in der Folge vermehrt metabolisiert. Die Konzentration der Zuckerverbindungen fällt ab. Die Bildung von DON verursacht während der Wildtyp-Infektion mittelbar oxidative-Stressschäden und eine Einleitung der Apoptose im Pflanzengewebe. Zeitgleich werden weniger ROS detoxifizierende Metabolite gebildet. Der Energiebedarf steigt während der Infektion mit dem Wildtyp an und führt zu einem vermehrten Butanoat- und Aminosäure-Katabolismus. Der Phenylpropanoid-Stoffwechsel ist induziert während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm. Ausgehend vom Phenylpropanoid-Stoffwechsel findet keine vermehrte Synthese von Syringyl-Lignin statt. Stattdessen wird die Cellulose und die Hemicellulosen der pflanzlichen Zellwand vermehrt abgebaut. Die vermehrten Katabolismus-Prozesse führen zu einem Anstieg der Glycolyse und Metaboliten des TCA-Zyklus. Der stressinduzierte GABA-shunt ist während der Infektion mit dem Wildtyp-Stamm aktiv und versorgt den TCA-Zyklus mit Succinat. Metabolite der Pflanzenverteidigung wie Dihydrojasmonsäure oder Riboflavin werden während der Wildtyp-Infektion weniger gebildet. Während der Wildtyp-Infektion kommt es zu einem Anstieg von Ursolsäure, der auf die Enzyme der Jasmonat-Synthese inhibierend wirken könnte.

Im Gegensatz dazu kommt es während der Infektion mit dem $\Delta tr5$ -Stamm nicht zu einem Absinken der Speicherstoffe, Zucker und Aminosäuren. Da kein DON synthetisiert wird, kommt es nicht zur Apoptose der Wirtszellen. Die Konzentration von ROS-detoxifizierenden Metaboliten steigt an und es kommt nicht zu oxidativen-Stressschäden. Der Phenylpropanoid-Stoffwechsel wird bei der Infektion mit dem

$\Delta tr5$ -Stamm ebenfalls aktiviert. Es sind keine Ab- und Umbauprozesse des Syringyl-Lignin sowie der Cellulose feststellbar. Zeitgleich kommt es zu einer vermehrten Synthese von Jasmonat und Riboflavin als Signalmolekülen der Pflanzenverteidigung. Die stärkere Induktion der Pflanzenverteidigung könnte daher durch beide Metabolite vermittelt werden. Der signifikante Anstieg des natürlichen cytotoxischen Lignans Deoxypodophyllotoxin könnte im Zusammenhang mit der Resistenz des $\Delta tr5$ -Stammes stehen.

4.12. Die Infektion mit dem Wildtyp führt zu einem Anstieg des GABA-shunts

Die aufgezeigten Veränderungen im Primär- und Sekundärstoffwechsel erfordern die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten und Grundgerüsten, die von dem primären Stoffwechsel synthetisiert werden. Während der Wildtyp-Infektion kommt es zu einem Absinken der Konzentrationen der Zuckerverbindungen sowie der Metabolisierung von Speicherstoffen und Aminosäuren. Dies legt den Schluss nahe, dass ein hoher Bedarf des Primärstoffwechsels an Metaboliten sowie Reduktionsäquivalenten besteht.

In *T. aestivum* ist das Gen Lr34 beteiligt an der Ausbildung einer partiellen Resistenz gegenüber dem Weizenrostpathogen *Puccinia triticina*. Die Lr34-vermittelte Resistenz führt zu einem Anstieg von Prozessen der Glykolyse, der β -Oxidation und des GABA-shunts, um Kohlenstoff-Quellen für den TCA-Zyklus liefern (Bolton *et al.* 2008). Das Bindeglied zwischen dem Primär- und dem Sekundärmetabolismus ist daher der Energiefluss (Bolton *et al.* 2009).

Ein wiederkehrendes Motiv ist dabei die vermehrte Metabolisierung von Zuckerverbindungen und Veränderungen in den Metaboliten des TCA-Zyklus. Ein Stoffwechselweg, der unter Stress-Bedingungen den TCA-Zyklus unterstützt, ist der GABA-shunt. Die Akkumulation von Succinat-Semialdehyd und GABA während der Wildtyp-Infektion deutet auf eine vermehrte Aktivität des GABA-shunts während der Infektion hin. GABA wird neben vielen abiotischen Stresszuständen auch infolge bakterieller und pilzlicher Infektionen gebildet (Solomon und Oliver 2002, Bouché und Fromm 2004, Park *et al.* 2010). Genetisch sowie biochemisch sind die beteiligten Enzyme und die katalysierten Reaktionsschritte gut aufgeklärt, sodass durch gezielte Genausschaltungen der gesamte GABA-Stoffwechsel unterbrochen werden kann. Die

Möglichkeit, den *F. graminearum* GABA-Stoffwechsel zu unterbrechen, ermöglicht es, die Bedeutung dieses Stoffwechselweges für die DON-Biosynthese sowie die Energiebereitstellung während der Infektion zu untersuchen.

4.13. Unterbrechung der Transaminierung im GABA-shunt

Um den GABA-Metabolismus zu unterbrechen, sind 4 Strategien denkbar. Die Aufnahme von GABA kann durch Deletion von Permeasen unterbrochen werden. In *S. cerevisiae* findet die Aufnahme von GABA durch eine spezifische GABA-Permease UGA4, eine generelle Aminosäuren-Permease und eine Prolin-Permease statt (Kumar und Punekar 1997). Da manche der Permeasen auch an der Aufnahme anderer Substrate beteiligt sind, kann die GABA-Aufnahme nicht spezifisch unterbrochen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Unterbrechung der Decarboxylierung von Glutamat (GAD-Reaktion), um den endogen prioritär beschrittenen Stoffwechselweg zur GABA-Bildung (Bouché und Fromm 2004) zu unterbrechen. Da GABA auch über den Abbau der Polyamine (Suzuki *et al.* 2013) sowie über den Urea-Zyklus hergestellt werden kann, führt die Unterbrechung der GAD-Reaktion nicht zwangsläufig zu einem völligen Ausfall der GABA-Synthese. Auf die Decarboxylierung folgt die Transaminierung, die in *F. graminearum* durch zwei Transaminasen stattfindet. Die Decarboxylierung von Glutamat findet als irreversible Reaktion statt, daher führt die Bildung von GABA über Glutamat zu einer Akkumulation von GABA. Die Unterbrechung am nächstfolgenden enzymatischen Schritt, der Dehydrogenierung von Succinat-Semialdehyd (SSADH-Reaktion) ist nur theoretisch vorstellbar. Im Genom von *F. graminearum* befinden sich 5 putative SSADH-Gene. Aufgrund der limitiert vorliegenden Resistenzmarker (Hygromycin, Geneticin, Nourseothricin) können nicht alle Gene in einem Stamm ausgeschaltet werden.

Die Bildung von GABA als Ergebnis der Decarboxylierung von Glutamat ist ein irreversibler Prozess, daher führt die Unterbrechung der Transaminierung zu einem Stopp des kompletten GABA-Metabolismus. Aus diesem Grund wurde der pilzliche GABA-Metabolismus durch Deletion zweier GABA-Transaminasen ausgeschaltet. Zu diesem Zweck wurden die Transaminasen einzeln (Δgta_1 und Δgta_2) sowie beide in einem Stamm ($\Delta\Delta gta_{1;2}$) ausgeschaltet.

4.14. Beide Transaminasen zeigen Substratspezifität und sind in den Polyamin-Katabolismus involviert

Die Δgta_1 -Mutanten zeigten eine deutliche Reduktion beim Wachstum auf β -Alanin, wohingegen die Δgta_2 -Mutanten schlechter mit GABA als einziger Stickstoffquelle wuchsen. Das radiale Wachstum war sehr stark eingeschränkt beim Wachstum der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf GABA, während das Wachstum auf β -Alanin vergleichbar mit dem der Δgta_1 -Mutanten war (Abbildung 14). In *F. graminearum* findet die Transaminierung von GABA durch *gta-1* und *gta-2* statt, während β -Alanin nicht durch *gta-2* transaminiert wird. In *S. cerevisiae* existiert nur eine GABA-Transaminase (UGA1), wohingegen in *S. kluyveri* zwei Transaminasen existieren, die spezifisch β -Alanin sowie GABA metabolisieren und die jeweils anderen Substrate nicht verwerten (Schnackerz *et al.* 2008). In dem Erreger des Maisbeulenbrandes *Ustilago maydis* führt die Deletion einer GABA-Transaminase zu einem verringerten Wachstum auf β -Alanin, aber zu einem unverändertem Wachstum mit GABA als einziger Stickstoffquelle (Straffon *et al.* 1996).

Beispiele für die Ähnlichkeiten zwischen β -Alanin-Transaminasen sowie GABA-Transaminasen finden sich auch in Pflanzen. In *A. thaliana* codiert das Gen *pop2* für eine GABA-Transaminase, die als Einzelkopie im Genom vorliegt. Wird dieses Gen ausgeschaltet, kommt es in den Blüten zu einem höchst signifikanten Anstieg sowohl von GABA als auch von β -Alanin (Palanivelu *et al.* 2003). Die *A. thaliana*-Transaminase setzt daher höchstwahrscheinlich beide Substrate um. Im Gegensatz dazu ist das Wachstum der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf β -Alanin nicht stärker eingeschränkt als das der Δgta_1 -Mutanten. Dies spricht dafür, dass zwar beide Enzyme synergistisch GABA transaminieren, jedoch nur eines in den β -Alanin-Stoffwechsel involviert ist.

Der Abbau der Polyamine Putrescin sowie Spermidin ist in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ebenfalls gestört (Abbildung 16). Die Polyamine Putrescin sowie Spermidin akkumulieren während der *F. graminearum* Weizenblüteninfektion und werden als mögliche zentrale Induktoren der DON-Biosynthese diskutiert (Gardiner *et al.* 2009, Gardiner *et al.* 2010). Der Abbau von Putrescin durch Diaminooxidasen bzw. Spermidin durch Polyamin-Oxidasen führt zu 4-Aminobutanal welches in der Folge durch eine Aldehyd-Dehydrogenase zu GABA umgesetzt wird. Die Aktivitäten beider Oxidasen set-

zen H_2O_2 frei, welches häufig im Kontext der Pflanzenverteidigung diskutiert wird (zusammengefasst durch Walters 2003).

4.15. Die Unterbrechung der GABA-Transaminierung führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber H_2O_2

Während der Infektion von Wirtspflanzen durch phytopathogene Pilze kommt es häufig zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) von beiden Interaktionspartnern (Heller und Tudzynski 2011). Die Bedeutung der ROS-Detoxifizierung konnte auch bei der Weizeninfektion von *F. graminearum* gezeigt werden (Ngyuen *et al.* 2012). Die Unterbrechung der GABA-Transaminierung in *F. graminearum* erhöht die Sensitivität gegenüber H_2O_2 (Abbildung 18).

Die Unterbrechung der GABA-Bildung durch Deletion der Glutamat-Decarboxylase führt in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten ROS-Sensitivität (Coleman *et al.* 2001). Sowohl in dem Weizenpathogen *Stagonospora nodorum* als auch in *M. oryzae* sind SSADH-Mutanten sensitiver gegenüber H_2O_2 Einwirkung (Guo *et al.* 2011, Mead *et al.* 2013). Die Deletion einer SSADH in *A. thaliana* führt zur Akkumulation von ROS nach UV-B oder Hitzestress (Bouché *et al.* 2003). Im menschlichen Zellen führen Veränderungen im Redox-Status zu Strukturveränderung einer SSADH, die höchstwahrscheinlich einen Kontrollmechanismus darstellen (Kim *et al.* 2009). Zusammengekommen korrelieren Störungen im GABA-Metabolismus häufig mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber ROS. Die Expression der sekretierten Katalasen ist in den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten unverändert (Tabelle 5), daher ist die Fähigkeit extrazellulär ROS zu detoxifizieren, höchstwahrscheinlich nicht betroffen.

Die Einwirkung von ROS führt häufig zu einer vermehrten Degradation der Aconitase, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase sowie der Succinyl-CoA-Ligase (Tretter und Adam Vizi 2000; Sweetlove *et al.* 2002). Die vermehrte Degradation dieser TCA-Enzyme führt daher unter oxidativen Stressbedingungen zu einer Verringerung der mitochondrialen Energieerzeugung. Im Metabolom des Wildtyp-infizierten Stammes kommt es zu einem Absinken der Konzentration von Citrat und Isocitrat (Abbildung 9). In *A. thaliana* sinken infolge einer veränderten Redoxbalance die Konzentrationen der Metabolite des vorderen Teils des TCA-Zyklus ab, während die Metabolite ab Succinat in ihren Konzentrationen ansteigen (Kolbe *et al.* 2006). Zusammengekommen führt die Degradation der TCA-Enzyme durch ROS-Einwirkung zur Notwendig-

keit, die Enzyme der späteren Reaktionen mit Substraten zu versorgen. Wird in *Solanum lycopersicum* die Expression einer Succinyl-CoA-Ligase herunterreguliert, werden die Folgen durch eine erhöhte Aktivierung des GABA-shunts kompensiert (Studart-Guimarães *et al.* 2007). Die Bildung von Succinat kann in diesem Fall durch den GABA-shunt übernommen werden. In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist die Metabolisierung von GABA nicht mehr möglich. Höchstwahrscheinlich führen daher ROS-Stressschäden zu einem Absinken der TCA-Metabolite, die nicht mehr durch den GABA-shunt kompensiert werden können.

4.16. Der GABA-shunt ist wichtig für die Perithezien-Bildung nicht jedoch für die Keimung der Konidien

In *Neurospora crassa* wurde ein Anstieg der Glutamat-Decarboxylierung beim Beginn der Keimung der Konidien festgestellt (Hao und Schmit 1993). Aus diesem Grund wurde die Keimungsrate der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sowie des Wildtyps untersucht (Tabelle 3). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen nachgewiesen. Der GABA-shunt ist daher kein essenzielles Element während der frühen Wachstumsphase in *F. graminearum*.

Während der Perithezien-Bildung hingegen, bilden die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten weitaus weniger Perithezien als der Wildtyp (Abbildung 19). Während der Induktion der Perithezien-Bildung in *F. graminearum* wird die *gta-1* bei allen Entwicklungsstadien signifikant induziert (Qi *et al.* 2006). Höchstwahrscheinlich ist daher der GABA-Metabolismus ein wichtiger Faktor für die Perithezien Entwicklung. Metabolomisch wurde ein GABA-Anstieg während der Fruchtkörper-Bildung in dem insektenparasitischen Ascomyzeten *Cordyceps bassiana* detektiert (Hyun *et al.* 2013). Es ist daher vorstellbar, dass der GABA-Metabolismus für die Energiegewinnung während der Perithezien-Bildung nötig ist. Im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist GABA an der Signaltransduktion beteiligt. Die Zugabe von GABA zum Medium führt zur Induktion des Vorläufer Signalpeptids AcbA. Im Anschluss wird die Protease TagC aktiviert, die aus dem Vorläuferpeptid das prozessierte Peptid SDF-2 herstellt, welches essenziell für die Fruchtkörper-Bildung ist (Anjard und Loomis 2006).

4.17. *gta-1* befindet sich in den Mitochondrien, während sich *gta-2* im Cytosol befindet

Die Untersuchung der Signalpeptide beider Transaminasen mittels WolfpSort (²) ergab, dass *gta-1* höchstwahrscheinlich in die Mitochondrien importiert wird, während *gta-2* sich im Cytosol befindet. Um die Lokalisation beider Enzyme zu überprüfen, wurden beide Transaminasen unter Kontrolle ihres jeweiligen nativen Promotors mit der codierenden Sequenz von eGFP fusioniert. Die Lokalisation von *gta-1* zeigte einen Import in Strukturen, die durch Rhodamin123 Färbung mit hoher Wahrscheinlichkeit als Mitochondrien identifiziert wurden. Im Gegensatz dazu befindet sich *gta-2* höchstwahrscheinlich im Cytosol und bildet stäbchenförmige Strukturen aus (Abbildung 17).

Für den GABA-Metabolismus in *F. graminearum* sind beide Transaminasen nötig. Trotzdem befinden sie sich nicht im gleichen Kompartiment. GABA muss daher durch Permeasen oder Transportproteine zwischen Mitochondrien und Cytosol transportiert werden. Die Existenz von GABA-Transaminasen Isoformen, die in verschiedene Organelle importiert werden, wurde in *Solanum lycopersicum* gezeigt (Clark *et al.* 2009). Spätere Studien in *O. sativa* konnten die Existenz verschieden lokalisierter GABA-T Isoformen bestätigen (Shimajiri *et al.* 2013). *Gta-1* transaminiert sowohl GABA als auch β -Alanin. Eine β -Alanin-Transaminase von *A. thaliana* wird höchstwahrscheinlich in die Mitochondrien importiert (The Plant Specific Database³). Es wäre daher möglich, dass die β -Alanin-Transaminierung zwingend in den Mitochondrien stattfinden muss. Die Akkumulation von *gat-2* in stäbchenförmigen Strukturen weist Ähnlichkeiten zur Struktur des Spetins AsB in *Aspergillus nidulans* auf (Hernández-Rodríguez *et al.* 2012). Im Mäuse-Cortex scheinen Septine und GABA-Transaminasen einen Komplex zu bilden (Kinoshita *et al.* 2001). Die Gründe für eine mögliche Komplexbildung mit den Septinen sind zur Zeit noch unbekannt.

In *S. cerevisiae* befinden sich sowohl UGA1 (GABA-T) als auch UGA2 (SSADH) im Cytosol (Hue *et al.* 2003). Die UGA1 Deletionsmutanten können dabei durch Expression der mitochondrialen *A. thaliana* GABA-Transaminase funktionell komplementiert

² <http://wolfpsort.seq.cbrc.jp> (Zugriff: 21.3.2014)

³ http://genomics.msu.edu/cgi-bin/plant_specific/locus_search.cgi?locus=At3g08860.1 (Zugriff: 25.5.2014)

werden, was den Schluss nahelegt, dass die Lokalisation der GABA-Transaminierung von untergeordneter Bedeutung ist (Cao *et al.* 2013). In *A. thaliana* wurde eine mitochondriale GABA-Permease bereits beschrieben, die das Bindeglied zwischen cytosolischen und mitochondrialen Reaktionsschritten darstellt (Mitchell *et al.* 2011). Da beide Transaminasen synergistisch am GABA-Metabolismus beteiligt sind, muss GABA sowohl im Cytosol als auch im mitochondrialen Lumen vorliegen.

4.18. GABA induziert die DON-Bildung *in vitro*

Das Wachstum der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf Putrescin als einziger Stickstoffquelle ist stark eingeschränkt (Abbildung 14). Der Abbau von Putrescin findet daher über GABA statt. *In vitro* führt die Zugabe von Putrescin zu einem Anstieg der DON-Synthese (Gardiner *et al.* 2009). Wird anstatt von Putrescin GABA eingesetzt kommt es zu einem vergleichbaren Anstieg der DON-Synthese (Abbildung 23). In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten kann die DON-Bildung weder durch Putrescin-Zugabe, noch durch GABA-Zugabe angeregt werden. Zusammengenommen kann daher die Aussage getroffen werden, dass die Wirkung von Putrescin auf die DON-Biosynthese abhängig ist von der Bildung von GABA.

Im Gegensatz zur Induktion mit Putrescin und GABA ist die DON-Synthese bei Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten induzierbar. Es existieren daher mindestens zwei Stoffwechselwege, die zur DON-Induktion *in vitro* führen: Der Polyamin/GABA-Weg und der Ammoniumsulfat-Weg. Die verschiedenen Wege zur DON-Induktion im *in-vitro*-System lassen den Schluss zu, dass höchstwahrscheinlich ein Faktorenkomplex für die DON-Synthese in der Pflanze verantwortlich ist.

Während der Weizenblüten-Infektion steigen die Konzentrationen der Polyamine Putrescin, Spermidin sowie Cadaverin an. Im zeitlichen Verlauf geht die Putrescin-Akkumulation der DON-Biosynthese voraus, was für eine Rolle von Putrescin als Induktor der pilzlichen Trichothecen-Biosynthese spricht (Gardiner *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die DON-Synthese bereits in den Infektionsstrukturen stattfindet, was gegen einen Einfluss der Polyamine spricht (Boenisch und Schäfer 2011). Die Infektion mit den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten führt nicht zu geringeren DON-Konzentrationen nach 5 oder 10 dpi (Abbildung 27). Da die Induktion über den Polyamin/GABA-Weg in den Mutanten nicht mehr erfolgen kann, sind

höchstwahrscheinlich weder die Polyamine noch GABA die Induktoren der Trichothecen-Synthese *in planta*.

Die Deletion von Tri6 als zentraler regulatorisch wirkender Transkriptionsfaktor der Trichothecene-Gene führt zu einem sehr starken Einbruch in der DON-Biosynthese (Proctor *et al.* 1995 b). In $\Delta tr6$ -Mutanten sinkt die Expression von beiden GABA-Transaminasen sowie von drei SSADH-Genen stark ab (Nasmith *et al.* 2011). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der GABA-Metabolismus ein unterstützender Stoffwechselweg der DON-Synthese ist. Die Verknüpfung zwischen Toxin-Produktion und Energiestoffwechsel konnte auch in der $\Delta tr5$ -Mutante demonstriert werden. Die Konzentration von GABA sinkt in den $\Delta tr5$ -Mutanten ab, was zeitgleich zu einem Absinken der GABA-T-Expression und der Citrat-Synthase (CS) führt (Chen *et al.* 2011). In den $\Delta\Delta gta_{1,2}$ -Mutanten kommt es nach Toxin-Induktion im GABA-Medium ebenfalls zu einem Absinken der CS-Expression. Wird die DON-Biosynthese in einem Induktionsmedium mit Ammonium induziert, kommt es zu einem äußerst starken GABA-Anstieg im Wildtyp (Lowe *et al.* 2010). In einem Medium mit Agmatin kommt es ebenfalls zur Induktion einer SSADH (Gardiner *et al.* 2009). Die Rekrutierung des GABA-Stoffwechsels unter DON induzierenden Bedingungen erfolgt daher unabhängig von der verwendeten Substanz. Wird Trichodien zu $\Delta tr5$ -Mutanten gegeben, kommt es umgekehrt wieder zu einer Induktion der GABA-shunt-Gene (Seong *et al.* 2009). DON-Induktion, GABA-Metabolismus und die Aktivität des TCA-Zyklus sind daher unter *in-vitro*-Bedingungen miteinander verbunden. Ein Metabolit, der alle drei Stoffwechselwege verbindet, ist Acetyl-CoA. 1. Die Bildung von DON findet über Farnesyl-Pyrophosphat ausgehend vom Acetyl-CoA statt. 2. Der TCA-Zyklus benötigt Acetyl-CoA als Metabolit. 3. Der Metabolismus durch den GABA-shunt kann zur Überbrückung des TCA-Zyklus stattfinden und damit die Konkurrenz zwischen DON-Synthese und Energieproduktion vermindern.

Unter DON induktiven Bedingungen könnte es zu einem Abfall von Acetyl-CoA kommen. Der GABA-shunt könnte daher eine anaplerotische Reaktion darstellen, um dem Mangel an Acetyl-CoA entgegenzuwirken. Dass ein vermehrter GABA-Metabolismus zu einem Anstieg des Acetyl-CoA-Levels führt, konnte in *A. thaliana* gezeigt werden (Fait *et al.* 2011). Während der DON-Induktion *in vitro* führt die mangelnde Metabolisierung von GABA zu einem Einbruch in der DON-Synthese. Im Gegensatz dazu ist ein möglicher Effekt von GABA auf die DON-Synthese während der Weizenblüteninfektion kompensierbar. Der Hypothese folgend, dass die DON-

Produktion ein erhöhtes Acetyl-CoA-Level erfordert, müssen daher andere Stoffwechselwege die Rolle des GABA-shunts während der Pflanzeninfektion übernehmen.

Eine Bereitstellung von Acetyl-CoA findet vermehrt durch den Abbau von Fettsäuren in der β -Oxidation in den Mitochondrien statt. Einige der wahrscheinliche Ziele von *Tri6* sind Gene des Lipid-Stoffwechsels bzw. der β -Oxidation (Nasmith *et al.* 2011). Ein mögliches Indiz, dass der Lipidstoffwechsel einen Einfluss auf die Toxin-Produktion hat, wurde in *F. graminearum* für die Pathogenitätslipase *Fgl1* bewiesen. Die Deletion von *Fgl1* führt dabei bei der Weizeninfektion zu einem Anstieg der Toxinproduktion, die mit einem Anstieg der Expression von *Tr5* korreliert (Voigt *et al.* 2007). Als weiteres Indiz können Mutanten eines Transkriptionsfaktors ($\Delta far 2$) herangezogen werden, die zu einem Anstieg der DON-Synthese *in planta* führen (Thi Thu Giang 2011). Beide Resultate zeigen damit unabhängig voneinander, dass Veränderungen im Lipidstoffwechsel in *F. graminearum* einen Einfluss auf die Toxinproduktion haben. In *Aspergillus nidulans*, *flavus* und *parasiticus* konnte durch Zugabe von Ölsäure die Sterigmatocystin- sowie Aflatoxin-Biosynthese induziert werden. In diesem Fall akkumuliert der Vorläufer-Metabolit beider Mykotoxine, die Norsolorininsäure, in den Peroxisomen als Organellen der β -Oxidation (Maggio-Hall *et al.* 2005). Die vermehrt detektierten Fettsäuren während der Wildtyp-Infektion sind ein Hinweis auf die verstärkte Triacylglycerid-Nutzung. Die Deletion des GABA-shunts könnte daher während der Weizenblüteninfektion durch eine vermehrte Acetyl-CoA-Bereitstellung durch lipolytische Prozesse kompensiert werden.

4.19. Die Aufnahme von GABA führt zu einem Absinken des pH-Wertes des Kulturmediums

Wird die DON-Synthese durch Zugabe von GABA, Putrescin-Dihydrochlorid oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ induziert, fällt der pH-Wert im Verlauf von 3 Tagen in allen Kulturen ab (Abbildung 24). Ein niedriger pH-Wert des Außenmediums ist ein notwendiges Element für die Induktion der DON-Synthese (Gardiner *et al.* 2009). Bei einem pH-Wert des Außenmediums von 4 werden bereits hohe DON-Konzentrationen gemessen (Gardiner *et al.* 2009). Diese Werte werden bei GABA erreicht und bei Putrescin-Dihydrochlorid sowie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unterschritten.

Die GABA-Permease in *A. nidulans* unterliegt der Kontrolle des pH gesteuerten Transkriptionsfaktors PacC und wird bei sauren pH-Werten exprimiert (Hutchings *et al.* 1999). Die Aufnahme von GABA und die Synthese von DON finden dabei beide präferenziell bei sauren pH-Werten statt. Mittels der gemessenen GABA-Konzentrationen im Überstand konnte gezeigt werden, dass beide Stämme GABA aus dem Außenmedium aufnehmen (Abbildung 20). Intrazellulär wird in *S. cerevisiae* GABA und Putrescin durch die Permease UGA4 in die Vakuole gebracht (Uemura *et al.* 2004). Die Aufnahme von GABA in die Vakuole findet daher wahrscheinlich im Antiport gegen Protonen statt (Sekito *et al.* 2008). Eine transitorische Speicherung von GABA in der Vakuole würde daher mit einem Überschuss von Protonen im Cytoplasma korrelieren. In *A. nidulans* ist eine pH-Homöostase des intrazellulären-pH-Wertes im Bereich von pH 1,5 bis pH 7 beschrieben (Hesse *et al.* 2002). Der cytoplasmatische pH-Wert wird in *Neurospora crassa* hauptsächlich über ATP-abhängige Protonenpumpen in der Plasmamembran konstant gehalten (Sanders *et al.* 1981). Die Aufnahme von GABA würde nach diesem Modell zu einem zeitweiligen Anstieg der Protonenkonzentration des Cytoplasmas führen. Wird GABA aufgenommen, kommt es daher höchstwahrscheinlich zu einem initialen Abfall des intrazellulären pH-Wertes, der in der Folge durch Protonenpumpen ausgeglichen wird. Die Ansäuerung des Außenmediums würde in diesem Modell durch die Aufnahme von GABA verursacht werden.

Wird $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Induktor der DON-Biosynthese eingesetzt, kommt es ebenfalls zu einem Abfall des extrazellulären pH-Wertes. In *Penicillium cyclopium* wird eine stöchiometrische Kopplung von Protonen-Sekretion und NH_4^+ -Aufnahme beschrieben (Roos und Luckner 1984). Es ist daher wahrscheinlich, dass analog zur GABA-Aufnahme der extrazelluläre pH-Wert aktiv abgesenkt wird.

4.20. Die Expression der strukturellen GABA-Katabolismus-Gene wird wahrscheinlich über die intrazelluläre Konzentration gesteuert

Während der Infektion der Weizenblüte wird 5 dpi signifikant mehr GABA während der Infektion mit dem Wildtyp und den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten gebildet (Abbildung 29). *In vitro* akkumulieren die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten GABA intrazellulär (Abbildung 20).

In UGA2-Mutanten (SSADH) von *S. cerevisiae* wurde ein identischer Trend zur intrazellulären GABA-Akkumulation beschrieben (Bach *et al.* 2009). Pop-2-Mutanten von

A. thaliana akkumulieren ebenfalls erhöhte GABA-Mengen in den Blüten (Palanivelu *et al.* 2009). Zusammengenommen deuten die Messungen des Kulturüberstandes sowie der intrazellulären GABA-Konzentration darauf hin, dass GABA in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten bis zum Erreichen einer gewissen Schwellengrenze aufgenommen wird.

In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wurde sowohl *in vitro* als auch während der Weizeninfektion ein transkriptioneller Anstieg von drei putativen SSADH-Genen sowie einer putativen GABA-Permease detektiert (Abbildung 21, Abbildung 30). Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten können GABA enzymatisch nicht mehr degradieren und beginnen nach Induktion GABA zu akkumulieren.

Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten akkumulieren unter *in vitro* Bedingungen signifikant mehr GABA als der Wildtyp. Die Expression der SSADH sowie der putativen GABA-Permease steigt gegenüber dem Wildtyp stark an. Während der frühen Weizeninfektion (5 dpi) ist die GABA-Konzentration bei der Infektion mit den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 29). Die Expression der SSADH und der putativen GABA-Permease steigt ebenfalls stark an (Abbildung 30). Dieser Anstieg kann als Indiz dienen, dass die erhöhte Expression *in planta* ebenfalls durch eine hohe intrazelluläre GABA-Konzentration induziert wird. Beide Gene des GABA-Katabolismus, UGA1 (GABA-Transaminasen) und UGA2 sind induzierbar nach GABA-Zugabe (Bach *et al.* 2009).

Eine plausible Erklärung für die starke Induktion dieser Gene ist eine konstant hohe intrazelluläre GABA-Konzentration, die in der Folge zu einer vermehrten Expression von Transkriptionsfaktoren des GABA-Katabolismus führt. Die Aufnahme von GABA wurde hauptsächlich im Modellorganismus *S. cerevisiae* beschrieben. Als positive Regulatoren des GABA-Metabolismus wurde die Transkriptionsfaktoren UGA3 sowie UGA35/Dal81 sowie UGA43 als negativer Regulator beschrieben (Kumar und Puneekar 1997). Die Induktion dieser Transkriptionsfaktoren findet in Anwesenheit von GABA statt (Vissers *et al.* 1990).

Nach diesem Modell wird in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten GABA akkumuliert. Die ansteigende GABA-Konzentration induziert über Transkriptionsfaktoren die Gene für den GABA-Abbau und Aufnahme. In der Folge kommt es zu einem Expressionsanstieg der SSADH und der putativen GABA-Permease. Die intrazelluläre Konzentration steigt durch die Aktivität der Permease weiter an. Intrazellulär kann die Konzentration

aufgrund der unterbrochenen Transaminierung nicht abgebaut werden. Bis zum Erreichen eines Schwellenwertes wird stetig mehr GABA aufgenommen.

Der GABA-Metabolismus ist nicht nur unter Kontrolle der beschriebenen Transkriptionsfaktoren, sondern wird durch den globalen Stickstoffregulator AreA gesteuert.

4.21. Der GABA-Metabolismus wird durch AreA reguliert

Der globale wirkende Transkriptionsfaktor AreA reguliert die Verstoffwechslung vieler Stickstoffquellen in filamentösen Ascomyzeten (Marzluf 1997). In *A. nidulans* ist die GABA-Permease sowie die spätere Verstoffwechslung unter Kontrolle von AreA (Bailey *et al.* 1979). In *F. graminearum* ist die Expression der putativen GABA-Permease zusammen mit allen strukturellen Genen (GABA-T sowie SSADH) unter positiver Kontrolle von AreA. Im Gegensatz dazu steigt in den Δ AreA-Mutanten die Expression der Glutamat-Decarboxylase sehr stark an (Abbildung 22). In *F. graminearum* ist AreA unter Stickstoffmangel-Bedingungen im Kern lokalisiert. Bei hohen Stickstoffkonzentrationen befindet sich AreA im Cytosol. (Min *et al.* 2012). AreA ist daher nur unter Stickstoffmangel-Bedingungen aktiv und induziert Gene für den Abbau weiterer Stickstoffverbindungen.

In *Nicotiana tabacum* finden Tages-Nacht Fluktuationen in den Konzentrationen von Glutamat und GABA in Sink-Blättern beziehungsweise Source-Blättern statt (Masciaux-Daubresse *et al.* 2002). Spekuliert wird daher, dass GABA ein transienter Stickstoffspeicher ist (Bouché und Fromm 2004). In *S. cerevisiae* werden akkumulierte Mengen an GABA möglicherweise in den Vakuolen gespeichert und stehen daher aufgrund der räumlichen Kompartimentierung für die Gene des GABA-Katabolismus nicht zur Verfügung (Bach *et al.* 2009). In Δ AreA-Mutanten ist die Expression der GAD stark hochreguliert, was für eine AreA vermittelte GAD-Reprimierung im Wildtyp spricht. Über AreA werden zwei Routen des GABA Stoffwechsels gesteuert. Die erste Variante findet unter reichhaltigen Stickstoff-Bedingungen statt und führt dazu, dass AreA in das Cytosol exportiert wird. In der Folge entfällt die Repression der GAD und Glutamat wird vermehrt zu GABA umgesetzt. Kommt es zum Stickstoffmangel, wird AreA in den Kern importiert und induziert die GABA-Katabolismus Gene. Zeitgleich wird die Umsetzung von Glutamat zu GABA unterbunden. AreA stellt damit das Bindeglied zwischen transistenter Speicherung und späterer Verstoffwech-

slung von GABA dar. Ausschlaggebend für den Wechsel zwischen beiden Varianten wäre daher der Stickstoffstatus der Zelle.

4.22. GABA wird während der Weizenblüten-Infektion gebildet

GABA wird während der Infektion mit dem Wildtyp signifikant nach 5 und 10 dpi gebildet. Bei der Infektion mit den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist die GABA-Konzentration nur nach 5 dpi erhöht. Nach 10 dpi ist die GABA-Konzentration in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf Höhe der Wasser inokulierten Kontrollproben (Abbildung 29)

Eine Vielzahl von abiotischen und biotischen Stressfaktoren führt zur GABA-Bildung in Pflanzen (Bown und Shelp 1997, Bouché und Fromm 2004). Die GAD-Regulation erfolgt synergistisch über einen sauren pH-Wert sowie die Aktivierung durch einen Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex (Snedden *et al.* 1992, Baum *et al.* 1996). Calcium-Ionen sind an der Signaltransduktion der Pflanzenverteidigung beteiligt (Lecourieux *et al.* 2006). Ein Calcium-Influx während der Infektion könnte daher zur GABA-Bildung führen. In *Oryza sativa* ist die GABA-Bildung durch Zugabe eines Elicitors aus der Zellwand von *M. oryzae* induzierbar (Takahashi *et al.* 2008). Ebenfalls in *O. sativa* wird die pflanzeigene GABA-Transaminase nach Befall mit dem inkompatiblen *M. oryzae* Stamm 131 weitaus schwächer exprimiert als bei Befall mit dem kompatiblen Stamm 007 (Wu *et al.* 2006). Die verringerte Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten führt daher höchstwahrscheinlich zu einer geringeren Induktion der GABA-Bildung in der Pflanze.

Entwicklungsbiologisch steigt die GABA-Konzentration von 5 dpi auf 10 dpi in den Wasser inokulierten Kontrollproben an. Wird in *A. thaliana* die GABA-Transaminierung ausgeschaltet (pop-2-Mutation), ist das Wachstum der pop-2-Samenschläuche zur Mikropyle gestört (Palanivelu *et al.* 2003). Die Autoren schlussfolgern, dass der GABA-Gradient ein notwendiges Element der Wegfindung während der Befruchtung durch den Pollen darstellt. Der GABA-Anstieg von 5 auf 15 dpi könnte daher auch an der Regulation von entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt sein.

4.23. Die Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf Weizen ist reduziert

Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sind stark signifikant in ihrer Virulenz auf Weizen reduziert (Abbildung 25). Die DON-Konzentration während der Infektion ist zwischen den

$\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten und dem Wildtyp nicht signifikant verschieden. Die verringerte Virulenz ist daher kein Resultat einer veränderten DON-Synthese. Die Ursachen der verringerten Virulenz sind Auswirkungen des unterbrochenen pilzlichen GABA-Metabolismus in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten.

Der GABA-Metabolismus in Pflanzen hat nicht nur Auswirkungen auf entwicklungsbiologische Prozesse sondern ist auch an der Signaltransduktion beteiligt. Sowohl sekretierte Enzyme, die am Aufbau der Zellwand beteiligt sind, als auch der Ethylen-Stoffwechsel werden durch GABA reguliert (Kathiresan *et al.* 1997, Renault *et al.* 2011). Ethylen und der Jasmonat-Stoffwechsel werden synergistisch reguliert (Lorenzo *et al.* 2002). Jasmonsäure ist ein wichtiges Element der Pflanzenverteidigung gegen nekrotrophe Pilze (Blée 2002). Die Schlüsselenzyme in der GABA-vermittelten Regulation der Ethylen-Synthese sind die ACC-Synthase (Aminocyclopropanecarboxylat-Synthase) sowie die ACC-Oxidase (Kathiresan *et al.* 1997). Die Expression beider Gene wurde im infizierten Pflanzengewebe des Wildtyps sowie der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten bestimmt. Die Expression beider Gene ist nicht signifikant verändert, was den Schluss nahe legt, dass die verringerte Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten auf Weizen kein Resultat einer veränderten pflanzlichen Ethylen-Synthese ist.

Der Anstieg von GABA infolge von pilzlichen Infektionen ist für einige Wirt-Pathogen-Systeme bereits beschrieben. Die Infektion von *Lycopersicon esculentum* mit dem biotrophen Pathogen *Cladosporium fulvum* führt z. B. zu einem Anstieg der GABA-Konzentration im apoplastischen Raum (Solomon und Oliver 2001). Da sowohl die Transkripte der pilzlichen GABA-T als auch der pflanzlichen GAD während der Infektion messbar waren, wird angenommen, dass GABA eine wichtige Stickstoffquelle für *C. fulvum* darstellt (Solomon und Oliver 2002). Störungen im GABA-Metabolismus des Pilzes gehen dabei einher mit einer verringerten Virulenz. Sowohl im Reispathogen *M. oryzae* als auch im Weizenpathogen *S. nodorum* führt die Ausschaltung von SSADH-Genen zu einer verringerten Virulenz auf den jeweiligen Wirtspflanzen (Guo *et al.* 2011, Mead *et al.* 2013).

Wird der GABA-Metabolismus durch Unterbrechung der Transaminierung ausgeschaltet ($\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten), ist sowohl eine Nutzung von GABA als Kohlenstoff- als auch als Stickstoffquelle ausgeschlossen (Abbildung 14, Abbildung 15).

Ein funktionierender GABA-Metabolismus ermöglicht es dem Wildtyp, GABA zur Deckung des Kohlenstoff- und Stickstoffbedarfs einzusetzen. Frei verfügbares GABA wird über den GABA-shunt in Form von Succinat in den TCA-Zyklus eingebracht

(Bouché und Fromm 2004). Als sekundärer Effekt sinkt die Menge an verfügbarem GABA für den pflanzlichen TCA-Zyklus ab.

In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten findet nach Erreichen eines Schwellenwertes keine weitere Aufnahme von GABA statt. Aufgenommenes GABA kann nicht für den pilzlichen Metabolismus genutzt werden. Steigt die GABA-Konzentration weiter an, nehmen die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten kein weiteres GABA mehr auf. Zusätzlich gebildete Mengen sind daher für den TCA-Zyklus des Wirts verfügbar. Die Lr34 vermittelte Resistenz gegenüber dem Rostpilz *Puccinia triticina* führt in Weizen zu einer vermehrten Expression von TCA-Genen und dem GABA-shunt (Bolton *et al.* 2008). Der TCA-Zyklus liefert Reduktionsäquivalente für die ATP-Generierung in der mitochondrialen Atmungskette. Wird die mitochondriale Energiebereitstellung in *F. graminearum* durch Deletion einer NADH: Ubiquinone Oxidoreduktase (Komplex I) verringert, führt dies zu einer reduzierten Virulenz während der Weizeninfektion (Seong *et al.* 2005). Die mitochondriale Respiration ist daher ein bedeutender Parameter für die pilzliche Pathogenität und die Resistenz des Wirts.

4.24. Die mitochondriale Respiration ist gestört in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten

Während der Weizenblüteninfektion von *F. graminearum* werden vermehrt mitochondriale Gene exprimiert im Vergleich zum Myzel in Kultur (Goswami *et al.* 2006). Die Energiebereitstellung ist daher von zentraler Bedeutung für die Infektion. Der GABA-shunt liefert Reduktionsäquivalente und Metabolite für den TCA-Zyklus und ist daher ein wichtiges Element der Energiebereitstellung unter Stressbedingungen (Bown und Shelp 1997). Die SSADH-Reaktion wird reprimiert durch hohe Konzentrationen von ATP sowie NADH (Bouché und Fromm 2004). Im menschlichen Gehirn wird durch hohe ATP-Level die Bindung der GAD an den Co-Faktor Pyridoxal-Phosphat gehemmt (Petroff 2002). Der GABA-shunt trägt daher nur bei Energiemangel zur Energieproduktion des TCA-Zyklus bei.

Der GABA-shunt steht daher in einer Wechselwirkung mit dem TCA generierten ATP-Level. Die Expression der Citrat-Synthase (CS) sowie der Succinat-Dehydrogenase (SD) sinkt in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nach Induktion mit GABA ab. Dieses Resultat legt den Schluss nahe, dass der unterbrochene GABA-Metabolismus zu einer verringerten TCA-Aktivität führt.

In *S. cerevisiae* wurde eine transkriptionelle Regulierung der TCA-Enzyme über die Konzentration an Intermediär-Metaboliten beschrieben (McCammon *et al.* 2003).

Wird in *A. thaliana* aus der GAD die Ca^{2+} /Calmodulin-Domäne entfernt, kommt es zu einem Anstieg von GABA in den Samen. Dieser GABA-Anstieg wird begleitet von einem transkriptionellen Anstieg von Genen, die eine Rolle im Elektronentransport einnehmen. Unter den erhöht exprimierten Genen befindet sich die SD (Fait *et al.* 2011). Wird in *F. graminearum* der GABA-Metabolismus unterbrochen, sinkt die Expression der SD ab. Das verringerte Expressionsniveau der SD in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ist wahrscheinlich eine direkte Folge eines Succinat-Mangels.

Die Expression der Citrat-Synthase wurde als Marker für die Aktivität des TCA-Zyklus eingesetzt (Bolton *et al.* 2008). In Übereinstimmung mit der verringerten SD-Expression ist die Expression der CS ebenfalls erniedrigt in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten. Wird in *F. graminearum* die DON-Produktion durch Deletion von *Trf5* ausgeschaltet, sinken die GABA-Konzentration, die GABA-T Expression sowie die CS-Expression ab (Chen *et al.* 2011). Ein verringerter GABA-Metabolismus resultiert daher in einer geringen CS-Expression. Zusammenfassend führt der unterbrochene GABA-Metabolismus zu einem Succinat- und NADH-Mangel im TCA-Zyklus. In der Folge sinkt die Expression der SD und CS in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten ab.

Ausgehend vom TCA-Zyklus wird die Atmungskette durch NADH als Substrat der NADH Dehydrogenasen (Komplex I) sowie Succinat als Substrat für die SD versorgt (Komplex II) (Cecchini 2003). Enzymatisch werden im letzten Schritt des GABA-Metabolismus sowohl Redoxäquivalente (NADH) als auch Succinat gebildet.

Die Bestimmung der mitochondrialen Energiebereitstellung mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Rhod123 ergab eine geringe Fluoreszenz in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten (Abbildung 32). Dieses Resultat zeigt, dass die Verstoffwechslung von GABA direkt an der Energiebereitstellung beteiligt ist. Die reduzierte Energieproduktion könnte aus einem kombinierten Substratmangel für die Enzyme der Komplexe I und II herühren.

Um die Abhängigkeit der mitochondrialen Atmung von einem funktionierenden GABA-Stoffwechsel näher zu untersuchen, wurde die Abnahme von Sauerstoff im Außenmedium (OCR) bestimmt. Sauerstoff ist der terminale Elektronenakzeptor in der Atmungskette. Die Menge an aufgenommenem Sauerstoff ermöglicht es daher, die mitochondriale Aktivität zu bestimmen. Unter Kontrollbedingungen steigt die OCR nach Zugabe von frischem Medium in beiden Stämmen an (Abbildung 33). Im

Gegensatz dazu fällt die Sauerstoffaufnahme nach Zugabe von GABA in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten sukzessive ab (Abbildung 34).

Die Zugabe von FCCP als Protonophor kann eingesetzt werden, um die maximale Leistungsfähigkeit der mitochondrialen Atmung zu bestimmen. Die Differenz zwischen der initial gemessenen basalen OCR sowie den höchsten OCR nach FCCP-Zugabe erlaubt, die mitochondriale Reservekapazität festzustellen. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei Zugabe von GABA wird bei beiden Stämmen kein Anstieg über die basale Atmung durch FCCP hervorgerufen. Die Atmungskette von *F. graminearum* scheint daher unter beiden Bedingungen mit maximaler Leistung zu arbeiten. Die Mittelwerte der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nach FCCP-Zugabe sind geringer als die OCR-Werte des Wildtyps. Dies spricht für eine Substratlimitierung der Komplexe der Atmungskette.

Als Maß für die ATP-Bereitstellung kann der Abfall in der Sauerstoffaufnahme vor und nach der Zugabe von Oligomycin bestimmt werden (Brand und Nicholls 2011). Oligomycin als Inhibitor der F_0 -Untereinheit führt dabei zu einem verzögerten Abbau des Protonengradienten und in der Folge zu einem Stopp der oxidativen Phosphorylierung. Die Oligomycin vermittelte OCR-Reduktion ist bei den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten weitaus geringer als im Wildtyp. Nach zwei Stunden akkumulieren die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten bereits hohe GABA-Konzentrationen (Abbildung 20). Die Wirkung von GABA auf die Respiration der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten beginnt nach ca. 35 Minuten und könnte daher mit dem mittels HPLC bestimmten Beginn der GABA-Aufnahme übereinstimmen. Die zunehmend geringere OCR der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten deutet daraufhin, dass eine konzentrationsbedingte Reduktion eintritt. In *pop-2*-Mutanten von *A. thaliana* bewirkt die Zugabe von GABA eine Reprimierung der Transkription einer ATP-Synthase (Renault *et al.* 2011). Eine zusätzliche Wirkung von intrazellulär akkumulierten GABA könnte daher in einer transkriptionellen Repression der ATP-Synthase bestehen.

Der Aufbau des elektrochemischen Gradienten im Intermembranraum der Mitochondrien ergibt sich aus dem Protonengradienten ΔpH sowie dem Ladungsgradienten $\Delta \psi_m$. Durch Aufnahme in den sauren Intermembranraum könnte GABA als Zwitterion in der äußeren Mitochondrienmembran protoniert werden und anschließend die geladene innere Mitochondrienmembran passieren. In diesem Modell ist die Permeabilität der inneren Mitochondrien-Membran für geladene Ionen weitaus geringer als die der äußeren Membran. Generell ist die äußere Mitochondrienmembran weitaus

durchlässiger für kleinere Moleküle als die selektive innere Mitochondrienmembran (Colombini *et al.* 1979). Der Transport vom Cytosol durch die äußere Mitochondrienmembran findet durch Porine statt. Dieser passive Transport ermöglicht einen Diffusionsausgleich. Da im Intermembranraum ein Überschuss an Protonen existiert, kann keine freie Diffusion von geladenen Molekülen aus dem Intermembranraum in das Cytosol stattfinden. Eine mögliche Erklärung sind spannungsabhängige Kanalproteine, sogenannte VDAC (Voltage-dependent-anion-Channel), die in Abhängigkeit vom $\Delta\psi_m$ sowie dem ΔpH geöffnet oder geschlossen werden (Colombini 2004). Eine Anreicherung von Kationen im Intermembranraum erscheint daher plausibel. Der Transport von GABA durch die innere Membran erfolgt höchstwahrscheinlich durch spezifische Transportproteine in der inneren Mitochondrienmembran.

In der Matrix findet die Transaminierung von GABA und die Einspeisung in den TCA-Zyklus statt. Durch die Transaminierung wird ein dynamisches Konzentrationsgefälle zwischen dem Intermembranraum und der Matrix erzeugt, was zu einem vermehrten Einstrom von GABA-Kationen führt. Die Wirkung von Oligomycin als Inhibitor der F_0 Untereinheit der ATP-Synthase (Komplex V) im Wildtyp führt dabei zu einem verzögerten Abbau des Protonengradienten. Die Aktivität der Komplexe I, III und IV sinkt ab und führt zu dem beobachteten Verlust der OCR nach Oligomycin-Zugabe (Abbildung 34). Die anschließende Zugabe von FCCP bewirkt eine freie Verteilung von Protonen und führt zu einem Anstieg der OCR.

In den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten wird GABA ebenfalls aufgenommen und beginnt sich intrazellulär zu akkumulieren (Abbildung 20). Analog zu der geschilderten Situation im Wildtyp wird GABA als Zwitterion in den Intermembranraum aufgenommen. Dort kommt es ebenfalls zu einer Protonierung. Im Gegensatz zum Wildtyp findet keine Transaminierung in der Matrix statt. Die Anreicherung von GABA-Kationen im Intermembranraum könnte daher nach dem Prinzip einer Ionenfalle erfolgen. Die Akkumulation der Ionen im Intermembranraum findet in diesem Modell aufgrund der besseren Permeabilität des GABA-Zwitterions statt (in Anlehnung an Crofts 1967 sowie Guarino und Cohen 1979).

GABA-Kationen beginnen sich im Intermembranraum zu akkumulieren und führen zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten ($\Delta\psi_{\text{mGABA}}$). Dieser besteht aus akkumulierten GABA-Kationen, die in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten nicht mehr abgebaut werden. In der Folge sinkt die Aktivität der Komplexe I, III und IV aufgrund des höheren Spannungsunterschiedes in der Membran ab. Der stetig ansteigende $\Delta\psi_{\text{mGABA}}$

Gradient im Intermembranraum führt zu einer verminderten Aktivität der Protonenpumpen und damit zu einem verringerten ΔpH -Gradienten. Der verringerte Protonenfluss in die Matrix führt ebenfalls zu einer geringeren Aktivität der Komplexe I, III und IV.

Wird in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten Oligomycin hinzugegeben, kommt es im Vergleich zur OCR im Wildtyp nur zu einer schwachen Reduktion (Abbildung 34). Nach diesem Modell tritt keine starke OCR-Reduktion in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten ein, weil der Aufbau des ΔpH -Gradienten durch den elektrochemischen GABA-Kationen-Gradienten bereits inhibiert wird. Als unterstützendes Indiz kann die Färbung mit dem Potentialfarbstoff Rhodamin123 hinzugezogen werden. Ein hoher Potentialgradient führt zu einer Akkumulation von Rhodamin123 in der mitochondrialen Matrix. In der Folge tritt nach einem initialen Anstieg der Fluoreszenz ein Quenching-Effekt ein, der die emittierte Fluoreszenz stark verringert (Baracca *et al.* 2003). Die verringerte Rhodamin123-Fluoreszenz in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten kann daher auf einen hohen Potentialgradienten in der mitochondrialen Membran hindeuten. Dieser bewirkt eine Aufnahme von Rhodamin123 bis zum Erreichen des Quenching-Effekts in der mitochondrialen Matrix.

Die anschließende Zugabe von FCCP bewirkt eine freie Verteilung der Protonen und hebt damit die Inhibierung durch den $\Delta\psi_{\text{mGAB}}$ -Gradienten zeitweilig auf. In der Folge kommt es in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten zu einem OCR-Anstieg.

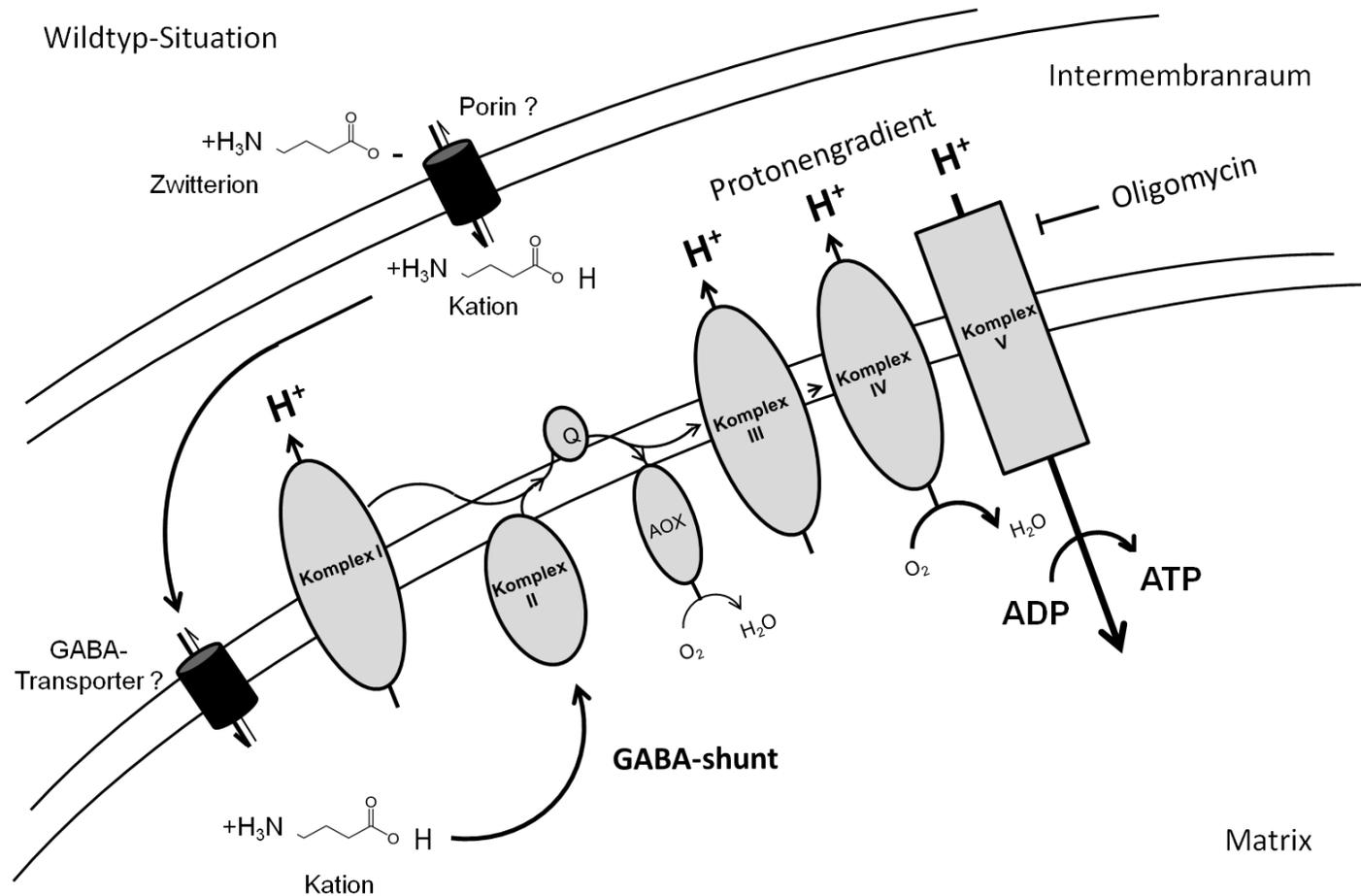


Abbildung 35 GABA-Akkumulation im mitochondrialen Intermembranraum (Wt-Situation). Im Wildtyp kommt es zu einer Aufnahme von GABA durch Porine. Mit dem Eintritt in die durchlässigere äußere Mitochondrienmembran wird GABA protoniert. Das gebildete Kation wird durch einen GABA-Transporter durch die innere Membran in die Matrix gebracht. Dort findet die Transaminierung und die Verstoffwechslung durch die Enzyme der Atmungskette statt. GABA kann daher im Wildtyp als Substrat für die Komplexe der Atmungskette genutzt werden. In der Folge ist die oxidative Phosphorylierung im Komplex V nach GABA-Zugabe erhöht.

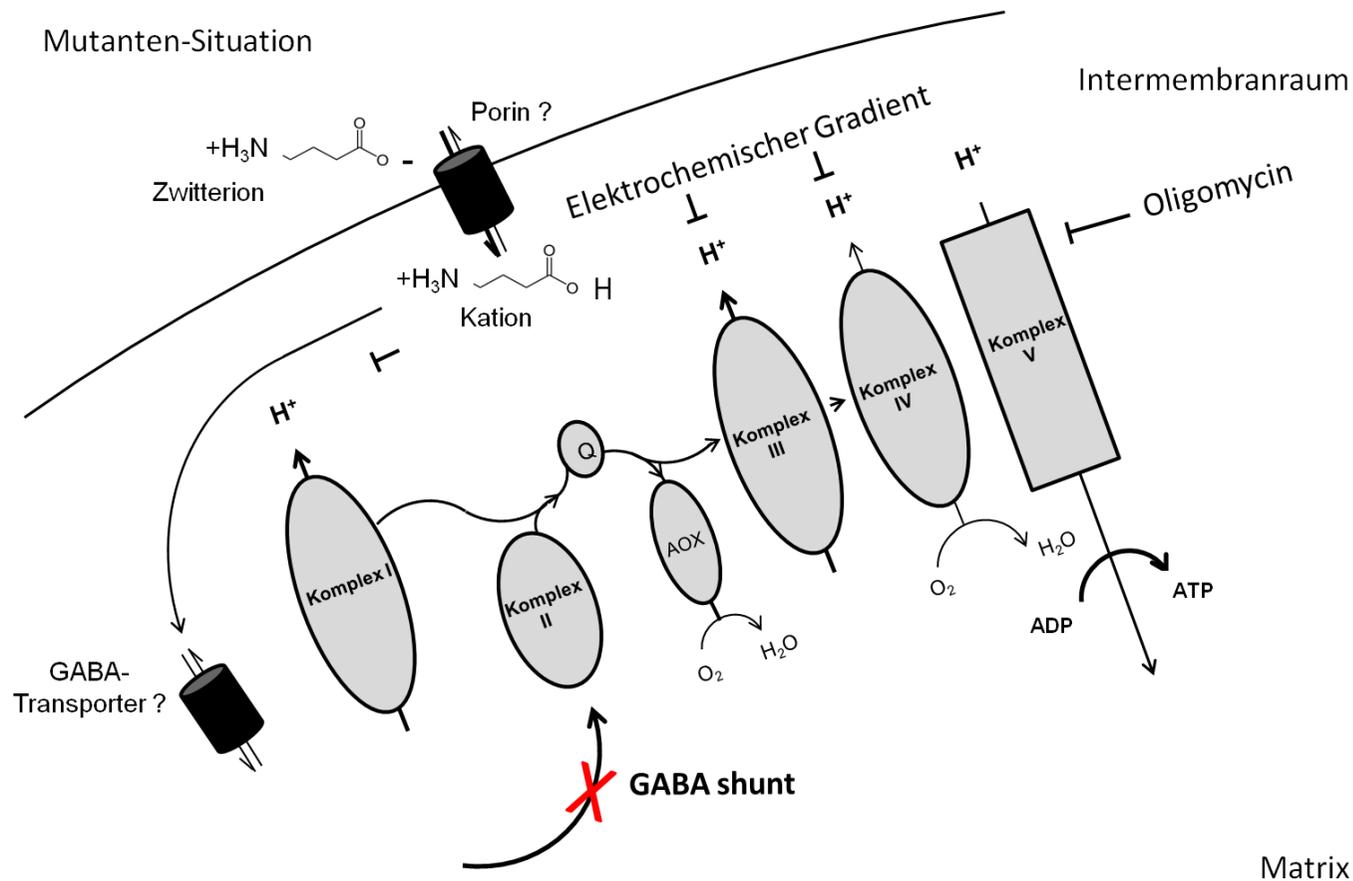


Abbildung 36 Akkumulation im mitochondrialen Intermembranraum (Mutanten-Situation). In den Mutanten kommt es analog zur Wildtyp-Situation zu einer Aufnahme von GABA in den Intermembranraum. Durch den bestehenden Potentialgradienten wird GABA protoniert und liegt als Kation vor. Da die Transaminierung in der Mutante unterbrochen ist, beginnen sich im Intermembranraum ständig mehr geladene GABA-Moleküle zu akkumulieren. Dieser entstehende Gradient ($\Delta\psi_{mGABA}$) wirkt dem Aufbau des Protonengradienten (ΔpH) entgegen. Durch Protonierung im Intermembranraum sinkt die Konzentration der Protonen ab. Es stehen für die Aktivität der Komplexe I, III und IV daher weniger Protonen zur Verfügung, die gegen einen höheren Widerstand transportiert werden müssen. In der Folge kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Repression der Aktivität der Komplexe I, III und IV.

Vergleichbare Beschreibungen finden sich in der Aufnahme von Ionen in den Thylakoid-Membranen von Chloroplasten. Amine können als Entkoppler der ATP-Synthese der Chloroplasten wirken (Crofts 1967). Die Aufnahme von NH_4^+ verschiebt dabei das Konzentrationsgefälle von NH_3 zu NH_4^+ , was in der Folge zu einem vermehrten Influx von NH_3 führt. Ein ähnliches Modell wurde für die Regulation der ATP-Synthese in Chloroplasten durch Putrescin-Zugabe beschrieben (Ioannidis *et al.* 2012).

Die Messung sämtlicher Parameter der mitochondrialen Leistungsentfaltung (OCR, Membranpotential, Expression) zeigt, dass eine Aufnahme von GABA einen negativen Rückkopplungseffekt in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten auslöst. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette in den $\Delta\Delta\text{gta}_{1;2}$ -Mutanten bei GABA-Zugabe verringert ist.

4.25. Zusammenfassung

Während der Infektion des Rachisknotens von Weizen mit dem *Fusarium graminearum* Wildtyp-Stamm kommt es zur einer Induktion der DON-Bildung. Ebenso werden Stress-Metabolite, wie Putrescin und GABA, vermehrt gebildet. Apoptose-Metabolite und durch erhöhte ROS-Produktion geschädigte Metabolite liegen akkumuliert vor. Der Phenylpropanoid-Stoffwechsel ist induziert. Es kommt zu einer verringerten Syringyl-Lignin-Synthese. Ebenfalls werden Cellulose und die Hemicellulosen der pflanzlichen Zellwand vermehrt abgebaut. Die vermehrten Katabolismus-Prozesse führen zu einem Anstieg der Glycolyse und Metaboliten des TCA-Zyklus. Metaboliten der Pflanzenverteidigung, wie Dihydrojasmonsäure oder Riboflavin, werden während der Wildtyp-Infektion weniger gebildet. Die Unterdrückung der Jasmonat-Synthese könnte aktiv durch einen Anstieg der Ursolsäure von Pilzseite stattfinden. Die Aktivierung des Sesquiterpen-Stoffwechsel führt zu einer vermehrten Synthese der Gibbereline, die möglicherweise durch Induktion der α -Amylasen die Metabolisierung der Stärke einleiten. Neben Stärke werden die Triacylglyceride vermehrt metabolisiert. Die Konzentration der Zuckerverbindungen fällt ab. Der Energiebedarf steigt während der Infektion mit dem Wildtyp an und führt zu einer einem vermehrten Butanoat- und Aminosäure-Katabolismus. Während der Infektion mit dem $\Delta\text{tr}5$ -Stamm kommt es nicht zu einem Absinken der Speicherstoffe, Zucker und Aminosäuren. Da kein DON synthetisiert wird, kommt es nicht zur Apoptose. Die Konzentration der ROS detoxifi-

zierenden Metabolite steigt an und es kommt nicht zu oxidativen Stressschäden. Es sind keine Ab- und Umbauprozesse des Syringyl-Lignin sowie der Cellulose feststellbar. Zeitgleich kommt es zu einer vermehrten Synthese von Jasmonat und Riboflavin als Signalmoleküle der Pflanzenverteidigung. Die stärkere Induktion der Pflanzenverteidigung könnte daher durch beide Metabolite vermittelt werden. GABA als Metabolit kann als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle eingesetzt werden und steht in Verbindung mit dem TCA-Zyklus.

Wird der GABA-shunt in *F. graminearum* ausgeschaltet, können sowohl die Polyamine als auch GABA nicht mehr verstoffwechselt werden. Dies resultiert in einer erhöhten Sensitivität gegenüber ROS-Stress und in einer geringeren Aktivität des TCA-Zyklus. In den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten wird die DON-Synthese *in vitro* sowohl mit Putrescin-Dihydrochlorid als auch mit GABA nicht mehr aktiviert. Durch Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ kann die DON-Synthese in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten *in vitro* hingegen induziert werden. Es führen daher *in vitro* zumindest zwei unabhängige Wege zur DON-Induktion. Während der Pflanzeninfektion ist die DON-Produktion der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nicht signifikant verändert und nicht durch den Putrescin-GABA-Metabolismus induzierbar. Die statistisch signifikante Reduktion der Virulenz der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten beruht daher auf anderen Ursachen. Die $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten akkumulieren GABA intrazellulär. Konzentrationsabhängig sinkt die Leistung der Atmungskette mit zunehmenden GABA-Konzentrationen.

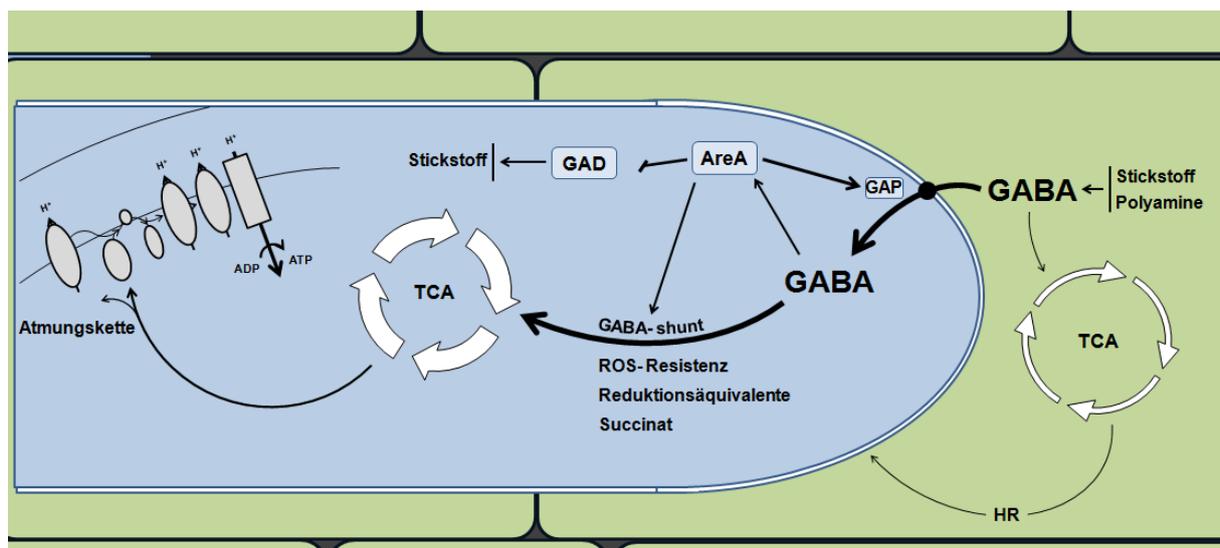


Abbildung 37 Zusammenfassung des GABA-Metabolismus zwischen *Triticum aestivum* und *Fusarium graminearum* während der Infektion. GABA dient als Kohlenstoffquelle für den TCA-Zyklus und stellt einen Weg für die Polyamin-Verstoffwechslung dar. Ausgehend vom TCA-Zyklus werden in der Pflanze Energie und Metabolite für die Einleitung der Hypersensitivitätsreaktion (HR) bereitgestellt. Wird GABA vom Pathogen durch die GABA-Permease (GAP) aufgenommen, wird es im

GABA-shunt verstoffwechselt. Dieser versorgt den TCA-Zyklus unter Stress-Bedingungen mit Succinat und erhöht so die Toleranz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die gebildeten Reduktionsäquivalente gehen in die Atmungskette ein und sorgen für eine vermehrte ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung.

Die Energieproduktion ist in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten nach längerer GABA-Einwirkung zusammengebrochen. Insgesamt bewirkt daher die Aufnahme von GABA in den $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten einen Einbruch in der mitochondrialen Sauerstoffaufnahme. Die additiv auftretenden Effekte auf die mitochondriale Atmungskette verringern die Energiebereitstellung der $\Delta\Delta gta_{1;2}$ -Mutanten während der Pflanzeninfektion, sodass in der Folge die Virulenz eingeschränkt ist.

5. Literatur

- Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B. and Cushman, J. C. (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant physiology*, 131, 1748-1755.
- Alcázar R, A. T., Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231, 1237-1249.
- Allan, W. L., Simpson, J. P., Clark, S. M. and Shelp, B. J. (2008) γ -Hydroxybutyrate accumulation in *Arabidopsis* and tobacco plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms. *Journal of experimental botany*, 59, 2555-2564.
- Allwood, J. W., Ellis, D. I. and Goodacre, R. (2008) Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia Plantarum*, 132, 117-135.
- Anjard, C. and Loomis, W. F. (2006) GABA induces terminal differentiation of *Dictyostelium* through a GABAB receptor. *Development*, 133, 2253-2261.
- Arruda, P., Kemper, E. L., Papes, F. and Leite, A. (2000) Regulation of lysine catabolism in higher plants. *Trends in plant science*, 5, 324-330.
- Ashraf, M. and Harris, P. J. C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166, 3-16.
- Bach, B., Meudec, E., Lepoutre, J.-P., Rossignol, T., Blondin, B., Dequin, S., *et al.* (2009) New insights into γ -aminobutyric acid catabolism: Evidence for γ -hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 75, 4231-4239.
- Bagni, N. and Tassoni, A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids*, 20, 301-317.
- Bailey, C. R., Penfold, H. A. and Arst Jr, H. N. (1979) Cis-dominant regulatory mutations affecting the expression of GABA permease in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG*, 169, 79-83.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. and Parr• Dobrzanski, B. (2002) The strobilurin fungicides. *Pest management science*, 58, 649-662.

- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., *et al.* (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *The EMBO journal*, 15, 2988.
- Bennett, J. W. and Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16, 497-516.
- Binzel, M. L., Hasegawa, P. M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A. K. and Bressan, R. A. (1987) Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant physiology*, 84, 1408-1415.
- Blée, E. (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in plant science*, 7, 315-322.
- Bluhm, B. H. and Woloshuk, C. P. (2005) Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Molecular plant-microbe interactions*, 18, 1333-1339.
- Blümke, A., Falter, C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schäfer, W., *et al.* (2014) Secreted Fungal Effector Lipase Releases Free Fatty Acids to Inhibit Innate Immunity-Related Callose Formation during Wheat Head Infection. *Plant physiology*, 165, 346-358.
- Boenisch, M. J. and Schäfer, W. (2011) *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC plant biology*, 11, 110.
- Bollina, V., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y. and Rioux, S. (2011) Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. *Plant molecular biology*, 77, 355-370.
- Bolton, M. D. (2009) Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular plant-microbe interactions*, 22, 487-497.
- Bolton, M. D., Kolmer, J. A., Xu, W. W. and Garvin, D. F. (2008) Lr34-mediated leaf rust resistance in wheat: transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways. *Molecular plant-microbe interactions*, 21, 1515-1527.
- Bor, M., Seckin, B., Ozgur, R., Yilmaz, O., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2009) Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Acta physiologiae plantarum*, 31, 655-659.

- Bostock, R. M., Kuc, J. A. and Laine, R. A. (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*, 212, 67-69.
- Bouché, N. and Fromm, H. (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends in plant science*, 9, 110-115.
- Bown, A. W. and Shelp, B. J. (1997) The Metabolism and Functions of [gamma]-Aminobutyric Acid. *Plant physiology*, 115, 1.
- Brand, M. and Nicholls, D. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J*, 435, 297-312.
- Breitkreuz, K. E., Allan, W. L., Van Cauwenberghe, O. R., Jakobs, C., Talibi, D., Andre B, Shelp., *et al.* (2003) A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 41552-41556.
- Brown, N. A., Urban, M., Van de Meene, A. M. L. and Hammond-Kosack, K. E. (2010) The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal biology*, 114, 555-571.
- Canel, C., Moraes, R. M., Dayan, F. E. and Ferreira, D. (2000) Podophyllotoxin. *Phytochemistry*, 54, 115-120.
- Cao, J., Barbosa, J. M., Singh, N. and Locy, R. D. (2013) GABA transaminases from *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* complement function in cytosol and mitochondria. *Yeast*, 30, 279-289.
- Carapito, R. I., Hatsch, D., Vorwerk, S., Petkovski, E., Jeltsch, J.-M. and Phalip, V. (2008) Gene expression in *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 738-748.
- Cavinder, B., Sihakolli, U., Fellows, K. M. and Trail, F. (2012) Sexual development and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- Cecchini, G. (2003) Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annual review of biochemistry*, 72, 77-109.
- Chen, F., Zhang, J., Song, X., Yang, J., Li, H., Tang, H., *et al.* (2011) Combined metabolomic and quantitative real-time PCR analyses reveal systems metabolic changes of *Fusarium graminearum* induced by *Tr5* gene deletion. *Journal of proteome research*, 10, 2273-2285.

- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. and Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110, 119-122.
- Clark, S. M., Di Leo, R., Van Cauwenberghe, O. R., Mullen, R. T. and Shelp, B. J. (2009) Subcellular localization and expression of multiple tomato gamma-aminobutyrate transaminases that utilize both pyruvate and glyoxylate. *Journal of experimental botany*, 60, 3255-3267.
- Coleman, S. T., Fang, T. K., Rovinsky, S. A., Turano, F. J. and Moye-Rowley, W. S. (2001) Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 244-250.
- Colombini, M. (1979) A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane.
- Colombini, M. (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Molecular and cellular biochemistry*, 256, 107-115.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., *et al.* (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 10352-10357.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17, 1195-1214.
- Covarelli, L., Turner, A. S. and Nicholson, P. (2004) Repression of deoxynivalenol accumulation and expression of Tri genes in *Fusarium culmorum* by fungicides *in vitro*. *Plant Pathology*, 53, 22-28.
- Crawford, L. A., Bown, A. W., Breitzkreuz, K. E. and Guinel, F. d. r. C. (1994) The synthesis of [gamma]-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant physiology*, 104, 865-871.
- Crofts, A. R. (1967) Amine uncoupling of energy transfer in chloroplasts I. Relation to ammonium ion uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 3352-3359.
- Desmond, O. J., Manners, J. M., Stephens, A. E., Maclean, D. J., Schenk, P. M., Gardiner, D. M., *et al.* (2008) The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular plant pathology*, 9, 435-445.
- Dickman, M. B. and de Figueiredo, P. (2013) Death Be Not Proud-Cell Death Control in Plant Fungal Interactions. *PLoS pathogens*, 9, e1003542.

- Divon, H. H. and Fluhr, R. (2007) Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS microbiology letters*, 266, 65-74.
- Dong, H. and Beer, S. V. (2000) Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology*, 90, 801-811.
- Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. and Sainsard-Chanet, A. (2000) A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4138-4143.
- Duveiller, E., Singh, R. P. and Nicol, J. M. (2007) The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica*, 157, 417-430.
- Fait, A., Nesi, A. N., Angelovici, R., Lehmann, M., Pham, P. A., Song, L., et al. (2011) Targeted enhancement of glutamate-to- γ -aminobutyrate conversion in *Arabidopsis* seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. *Plant physiology*, 157, 1026-1042.
- Gancedo, C. and Flores, C. L. (2004) The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS yeast research*, 4, 351-359.
- Gardiner, D. M., Kazan, K. and Manners, J. M. (2009) Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 604-613.
- Gardiner, D. M., Kazan, K., Praud, S., Torney, F. J., Rusu, A. and Manners, J. M. (2010) Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. *BMC plant biology*, 10, 289.
- Gardiner, D. M., Osborne, S., Kazan, K. and Manners, J. M. (2009) Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology*, 155, 3149-3156.
- Gilbert, J. and Fernando, W. G. D. (2004) Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae/Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26, 464-472.
- Gilchrist, D. G. (1997) Mycotoxins reveal connections between plants and animals in apoptosis and ceramide signaling. *Cell Death & Differentiation*, 4.
- Gilchrist, D. G. and Grogan, R. G. (1976) Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 66, 165-171.

- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Goswami, R. S. and Kistler, H. C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular plant pathology*, 5, 515-525.
- Goswami, R. S., Xu, J.-R., Trail, F., Hilburn, K. and Kistler, H. C. (2006) Genomic analysis of host-pathogen interaction between *Fusarium graminearum* and wheat during early stages of disease development. *Microbiology*, 152, 1877-1890.
- Guarino, L. A. and Cohen, S. S. (1979) Uptake and accumulation of putrescine and its lethality in *Anacystis nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 3184-3188.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A. C., Duggavathi, R., Fox, S. and Somers, D. J. (2012) Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 7, e40695.
- Guo, M., Chen, Y., Du, Y., Dong, Y., Guo, W., Zhai, S., *et al.* (2011) The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens*, 7, e1001302.
- Hamzehzarghani, H., Kushalappa, A. C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., Yaylayan, V., *et al.* (2005) Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against *Fusarium* head blight. *Physiological and molecular plant pathology*, 66, 119-133.
- Hao, R. and Schmit, J. C. (1993) Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.*, 293, 735-738.
- Heller, J. and Tudzynski, P. (2011) Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology*, 49, 369-390.
- Hernandez-Rodriguez, Y., Hastings, S. and Momany, M. (2012) The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell*, 11, 311-323.
- Hesse, S. J. A., Ruijter, G. J. G., Dijkema, C. and Visser, J. (2002) Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *European journal of biochemistry*, 269, 3485-3494.

- Hickey, P. C., Swift, S. R., Roca, M. G. and Read, N. D. (2005) Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Methods Microbiol*, 34, 63-87.
- Huang, M., Camara, A., Stowe, D., Qi, F. and Beard, D. (2007) Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. *Annals of biomedical engineering*, 35, 1276-1285.
- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 101-127.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., *et al.* (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425, 686-691.
- Hutchings, H., Stahmann, K., Roels, S., Espeso, E. A., Timberlake, W. E., Arst Jr, H. N., *et al.* (1999) The multiply-regulated *gabA* gene encoding the GABA permease of *Aspergillus nidulans*: a score of exons. *Molecular microbiology*, 32, 557-568.
- Hyun, S.-H., Lee, S.-Y., Sung, G.-H., Kim, S. H. and Choi, H.-K. (2013) Metabolic Profiles and Free Radical Scavenging Activity of *Cordyceps bassiana* Fruiting Bodies According to Developmental Stage. *PLoS One*, 8, e73065.
- Ilgen, P., Hadelar, B., Maier, F. J. and Schäfer, W. (2009) Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 22, 899-908.
- Ioannidis, N. E., Cruz, J. A., Kotzabasis, K. and Kramer, D. M. (2012) Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit. *PLoS One*, 7, e29864.
- Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A. and Maier, F. J. (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16892-16897.
- Jennings, D. B., Daub, M. E., Pharr, D. M. and Williamson, J. D. (2002) Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *The Plant Journal*, 32, 41-49.
- Jennings, D. B., Ehrenschaft, M., Pharr, D. M. and Williamson, J. D. (1998) Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 15129-15133.

- Jiao, F., Kawakami, A. and Nakajima, T. (2008) Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS microbiology letters*, 285, 212-219.
- Jobic, C. c., Boisson, A.-M., Gout, E., Rascle, C., Fèvre, M., Cotton, P., *et al.* (2007) Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta*, 226, 251-265.
- Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C. C. and Reid, D. M. (1997) [gamma]-Aminobutyric Acid Stimulates Ethylene Biosynthesis in Sunflower. *Plant physiology*, 115, 129-135.
- Kazan, K., Gardiner, D. M. and Manners, J. M. (2012) On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular plant pathology*, 13, 399-413.
- Keller, N. P. and Hohn, T. M. (1997) Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 21, 17-29.
- Kim, Y. G., Lee, S., Kwon, O. S., Park, S. Y., Lee, S. J., Park, B. J., *et al.* (2009) Redox-switch modulation of human SSADH by dynamic catalytic loop. *EMBO J*, 28, 959-968.
- Kimura, A., Takano, Y., Furusawa, I. and Okuno, T. (2001) Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. *The Plant Cell Online*, 13, 1945-1957.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S. and Fujimura, M. (2007) Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71, 2105-2123.
- Kinnersley, A. M. and Turano, F. J. (2000) Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 479-509.
- Kinoshita, M. F., C. M.; Coughlin, M. L.; Matsuda, K.; Tamaki, N.; Kawamata, T.; Mitchison, T. J. (2001) Septin complex as a scaffold for GABA-aminotransferase in the mammalian brain. *Society For Neuroscience Abstracts*.
- Kolbe, A., Oliver, S. N., Fernie, A. R., Stitt, M., van Dongen, J. T. and Geigenberger, P. (2006) Combined transcript and metabolite profiling of *Arabidopsis* leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism. *Plant physiology*, 141, 412-422.

- Kruger, W. M., Pritsch, C., Chao, S. and Muehlbauer, G. J. (2002) Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 15, 445-455.
- Kumar, S. and Puneekar, N. S. (1997) The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycological Research*, 101, 403-409.
- Kumaraswamy, G. K., Bollina, V., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y., Rioux, S., *et al.* (2011) Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*. *European journal of plant pathology*, 130, 29-43.
- Laidman, D. L. and Tavener, R. J. (1971) Triglyceride mobilization in the germinating wheat grain. *Biochem. J*, 124, 4P-5P.
- Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R. and Coruzzi, G. M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual review of plant biology*, 47, 569-593.
- Le, T. T. G. (2011) Characterization of transcription factors important for fatty acid and lipid metabolism in the phytopathogen *Fusarium graminearum*. *Doktorarbeit, Universität Hamburg*.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R. and Pugin, A. (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytologist*, 171, 249-269.
- Li, G. and Yen, Y. (2008) Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop science*, 48, 1888-1896.
- Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H. and Greenberg, J. T. (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes & development*, 17, 2636-2641.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A. R. (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1, 387-396.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J. and Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell Online*, 15, 165-178.
- Lowe, R. G. T., Allwood, J. W., Galster, A. M., Urban, M., Daudi, A., Canning, G., *et al.* (2010) A combined ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-mass spectrometry analysis to understand the basal metabolism of plant-pathogenic *Fusarium* spp. *Molecular plant-microbe interactions*, 23, 1605-1618.

- Maggio-Hall, L. A., Wilson, R. A. and Keller, N. P. (2005) Fundamental contribution of β -oxidation to polyketide mycotoxin production *in planta*. *Molecular plant-microbe interactions*, 18, 783-793.
- Maier, F. J., Miedaner, T., Hadelers, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., *et al.* (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tr5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular plant pathology*, 7, 449-461.
- Malonek, S., Rojas, M. C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. and Tudzynski, B. (2004) The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 25075-25084.
- Marzluf, G. A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 17-32.
- Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M. H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M. and Hirel, B. (2002) Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant, Cell & Environment*, 25, 1451-1462.
- Mazzucotelli, E., Tartari, A., Cattivelli, L. and Forlani, G. (2006) Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *Journal of experimental botany*, 57, 3755-3766.
- McCammon, M. T., Epstein, C. B., Przybyla-Zawislak, B., McAlister-Henn, L. and Butow, R. A. (2003) Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Molecular biology of the cell*, 14, 958-972.
- McMullen, M., Jones, R. and Gallenberg, D. (1997) Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant disease*, 81, 1340-1348.
- Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B. and Solomon, P. S. (2013) Characterising the Role of GABA and Its Metabolism in the Wheat Pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLoS One*, 8, e78368.
- Merhej, J., Boutigny, A.-L., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F. and Barreau, C. (2010) Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Food Additives and Contaminants*, 27, 710-717.
- Mesterhazy, A. (1995) Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant breeding*, 114, 377-386.

- Meyer, A., Eskandari, S., Grallath, S. and Rentsch, D. (2006) AtGAT1, a high affinity transporter for gamma-aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7197-7204.
- Michaeli, S., Fait, A., Lagor, K., Nunes• Nesi, A., Grillich, N., Yellin, A., *et al.* (2011) A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *The Plant Journal*, 67, 485-498.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C. and Schilling, A. G. (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, 124-134.
- Min, K., Shin, Y., Son, H., Lee, J., Kim, J. C., Choi, G. J., *et al.* (2010) Functional analyses of the nitrogen regulatory gene *areA* in *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiol Lett*, 334, 66-73.
- Mishra, A. K., Sharma, K. and Misra, R. S. (2012) Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*, 7, 95-120.
- Mitchell, H. J., Hall, J. L. and Barber, M. S. (1994) Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant physiology*, 104, 551-556.
- Munné-Bosch, S. (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of plant physiology*, 162, 743-748.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., *et al.* (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230, 517-527.
- Nasmith, C. G., Walkowiak, S., Wang, L., Leung, W. W. Y., Gong, Y., Johnston, A., *et al.* (2011) Tri6 is a global transcription regulator in the phytopathogen *Fusarium graminearum*. *PLoS pathogens*, 7, e1002266.
- Nguyen, T. V., Schäfer, W. and Bormann, J. (2012) The stress-activated protein kinase FgOS-2 is a key regulator in the life cycle of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 25, 1142-1156.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology*, 147, 1251-1263.

- Packer, L., Witt, E. H. and Tritschler, H. J. r. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, 227-250.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A. F. and Preuss, D. (2003) Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by POP2, an *Arabidopsis* Gene that Controls GABA Levels. *Cell*, 114, 47-59.
- Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., *et al.* (2010) Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence. *The Plant Journal*, 64, 318-330.
- Parker, D., Beckmann, M., Zubair, H., Enot, D. P., Caracuel-Rios, Z., Overy, D. P., *et al.* (2009) Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic reprogramming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Journal*, 59, 723-737.
- Paulitz, T. C. (1999) *Fusarium* head blight: a re-emerging disease. *Phytoprotection*, 80, 127-133.
- Petroff, O. A. C. (2002) Book Review: GABA and glutamate in the human brain. *The Neuroscientist*, 8, 562-573.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30, e36-e36.
- Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., *et al.* (2005) Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Curr Genet*, 48, 366-379.
- Ponts, N., Couedelo, L., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, M. N. I., Barreau, C. and Richard-Forget, F. (2009) *Fusarium* response to oxidative stress by H₂O₂ is trichothecene chemotype-dependent. *FEMS microbiology letters*, 293, 255-262.
- Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A. and Vance, C. P. (2000) Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 13, 159-169.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M. and McCormick, S. P. (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8, 593-601.

- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H. and van den Hondel, C. A. (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56, 117-124.
- Qi, W., Kwon, C. and Trail, F. (2006) Microarray analysis of transcript accumulation during perithecium development in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 87-100.
- Renault, H., El Amrani, A., Palanivelu, R., Updegraff, E. P., Yu, A., Renou, J.-P., et al. (2011) GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, 52, 894-908.
- Renault, H., Roussel, V. r., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A., et al. (2010) The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC plant biology*, 10, 20.
- Roberts, M. R. (2007) Does GABA act as a signal in plants. *Plant signaling & behavior*, 2, 408-409.
- Rocha, O., Ansari, K. and Doohan, F. M. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 369-378.
- Roos, W. and Luckner, M. (1984) Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *Journal of general microbiology*, 130, 1007-1014.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (1989) Molecular Cloning. 2001. A Laboratory Manual. *Molecular Cloning: a*, 201, 1-3.
- Sanders, D., Hansen, U.-P. and Slayman, C. L. (1981) Role of the plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 5903-5907.
- Schnackerz, K. D., Andersen, G., Dobritsch, D. and Piskur, J. (2008) Degradation of pyrimidines in *Saccharomyces kluyveri*: transamination of beta-alanine. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 27, 794-799.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-675.
- Schroeder, H. W. and Christensen, J. J. (1963) Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53, 831-838.
- Sekito, T., Fujiki, Y., Ohsumi, Y. and Kakinuma, Y. (2008) Novel families of vacuolar amino acid transporters. *IUBMB life*, 60, 519-525.

- Seong, K., Hou, Z., Tracy, M., Kistler, H. C. and Xu, J.-R. (2005) Random insertional mutagenesis identifies genes associated with virulence in the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 95, 744-750.
- Seong, K. Y., Pasquali, M., Zhou, X., Song, J., Hilburn, K., McCormick, S., et al. (2009) Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Molecular microbiology*, 72, 354-367.
- Shelp, B. J., Mullen, R. T. and Waller, J. C. (2012) Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions. *Trends in plant science*, 17, 57-59.
- Shimajiri, Y., Ozaki, K., Kainou, K. and Akama, K. (2013) Differential subcellular localization, enzymatic properties and expression patterns of γ -aminobutyric acid transaminases (GABA-Ts) in rice (*Oryza sativa*). *Journal of plant physiology*, 170, 196-201.
- Snedden, W. A., Arazi, T., Fromm, H. and Shelp, B. J. (1995) Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant physiology*, 108, 543-549.
- Snedden, W. A., Chung, I., Pauls, R. H. and Bown, A. W. (1992) Proton/L-glutamate symport and the regulation of intracellular pH in isolated mesophyll cells. *Plant physiology*, 99, 665-671.
- Solomon, P. S. and Oliver, R. P. (2002) Evidence that γ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta*, 214, 414-420.
- Solomon, P. S., Waters, O. D. C. and Oliver, R. P. (2007) Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in microbiology*, 15, 257-262.
- Sposato, P., Ahn, J. H. and Walton, J. D. (1995) Characterization and disruption of a gene in the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* encoding a cellulase lacking a cellulose binding domain and hinge region. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 602-609.
- Stack, R. W. (1999) Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. *APSnet Plant Health Reviews*.
- Steward, F. C., Thompson, J. F., and Dent, C. E. 1 (1949) γ -aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber? *Science*.
- Straffon, M. J., Hynes, M. J. and Davis, M. A. (1996) Characterization of the *gatA* gene of *Ustilago maydis*, isolated by homology to the *gatA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Current genetics*, 29, 360-369.
- Stuart-Guimarães, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. and Fernie, A. R. (2007) Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compen-

- sated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. *Plant Physiol*, 145, 626-639.
- Sutton, J. C. (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.
- Suzuki, T., Kim, Y.-K., Yoshioka, H. and Iwahashi, Y. (2013) Regulation of metabolic products and gene expression in *Fusarium asiaticum* by agmatine addition. *Mycotoxin research*, 29, 103-111.
- Sweetlove, L. J., Heazlewood, J. L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D. A., Leaver, C. J., *et al.* (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *The Plant Journal*, 32, 891-904.
- Tahsili, J., Sharifi, M., Safaie, N., Esmailzadeh-Bahabadi, S. and Behmanesh, M. (2014) Induction of lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Interactions*, 1-6.
- Takahashi, H., Matsumura, H., Kawai-Yamada, M. and Uchimiya, H. (2008) The cell death factor, cell wall elicitor of rice blast fungus (*Magnaporthe grisea*) causes metabolic alterations including GABA shunt in rice cultured cells. *Plant signaling & behavior*, 3, 945-953.
- Tan, K. C., Ipcho, S. V. S., Trengove, R. D., Oliver, R. P. and Solomon, P. S. (2009) Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Molecular plant pathology*, 10, 703-715.
- Tarek El-Bashiti, H. H., Hüseyin A. Öktem, Meral Yücel (2005) Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science*, 169, 47-54.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., *et al.* (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 15107-15111.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*, 141, 373-378.
- Trail, F. (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant physiology*, 149, 103-110.

- Tretter, L. and Adam-Vizi, V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *The Journal of Neuroscience*, 20, 8972-8979.
- Tudzynski, B. (2005) Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 597-611.
- Varner, J. E. (1964) Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in barley endosperm. *Plant physiology*, 39, 413.
- Vissers, S., Andre, B., Muyldermans, F. and Grenson, M. (1990) Induction of the 4-aminobutyrate and urea-catabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Specific and common transcriptional regulators. *European journal of biochemistry*, 187, 611-616.
- Voigt, C. A., Schäfer, W. and Salomon, S. (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal*, 42, 364-375.
- Voigt, C. A., von Scheidt, B., Gacser, A., Kassner, H., Lieberei, R., Schäfer, W., et al. (2007) Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *European journal of plant pathology*, 117, 1-12.
- Walters, D. (2003) Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist*, 159, 109-115.
- Walther, A. and Wendland, J. (2012) Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 697-707.
- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S.-y., et al. (2008) A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 20, 471-481.
- Wang, Z.-Y., Soanes, D. M., Kershaw, M. J. and Talbot, N. J. (2007) Functional analysis of lipid metabolism in *Magnaporthe grisea* reveals a requirement for peroxisomal fatty acid beta-oxidation during appressorium-mediated plant infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 20, 475-491.
- Wasternack, C., Atzorn, R., Blume, B., Leopold, J. and Parthier, B. (1993) Ursolic acid inhibits synthesis of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Phytochemistry*, 35, 49-54.

- Winston, F., Dollard, C. and Ricupero-Hovasse, S. L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, 11, 53-55.
- Wu, C., Zhou, S., Zhang, Q., Zhao, W. and Peng, Y. (2006) Molecular cloning and differential expression of an γ -aminobutyrate transaminase gene, OsGABA-T, in rice (*Oryza sativa*) leaves infected with blast fungus. *Journal of plant research*, 119, 663-669.
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., Tong, X.-H., Zeng, L.-J., Li, Q., *et al.* (2012) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E1192-E1200.
- Yoda, H., Hiroi, Y. and Sano, H. (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant physiology*, 142, 193-206.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T. and Konzak, C. F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14, 415-421.
- Zastawny, T. H., Dabrowska, M., Jaskolski, T., Klimarczyk, M., Kulinski, L., Koszela, A., *et al.* (1998) Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 722-725.
- Zhang, S., Yang, X., Sun, M., Sun, F., Deng, S. and Dong, H. (2009) Riboflavin-induced Priming for Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of integrative plant biology*, 51, 167-174.
- Zheng, D., Zhang, S., Zhou, X., Wang, C., Xiang, P., Zheng, Q., *et al.* (2012) The FgHOG1 pathway regulates hyphal growth, stress responses, and plant infection in *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 7, e49495.
- Zhou, W., Eudes, F. o. and Laroche, A. (2006) Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics*, 6, 4599-4609.
- Zhou, W., Kolb, F. L. and Riechers, D. E. (2005) Identification of proteins induced or upregulated by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 48, 770-780.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. and Manes, J. (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and chemical toxicology*, 45, 1-18.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ohne seine stetige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse an jedem Projektfortschritt hätte diese Arbeit nicht entstehen können. Ich möchte mich ebenfalls sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Christian Voigt für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Jörg Bergemann und Herrn Daniel Gebhard möchte ich mich sehr herzlich für die XF24-Messungen und die sehr guten Diskussionen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei und Herrn Thomas Tumforde möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich für die HPLC-Messungen im Weizengewebe bedanken.

Bei Herrn Dr. Jörg Bormann möchte ich mich für die exzellente Betreuung meiner Doktorarbeit und seine ständige Bereitschaft, Resultate und Hypothesen zu diskutieren, bedanken.

Im Besonderen möchte ich mich bei allen BTA-Schülern der G13 bedanken. Ich hoffe, Euch hat es ebenso viel Spaß gemacht wie mir (wenn man vom Karottenagar mal absieht).

Im Speziellen möchte ich mich bei: Cathrin Kröger, Birgit Hadel, Kerstin Wolff, Dr. Ana Lilia Martínez-Rocha, Dr. Peter Willingmann und Brigitte Doormann bedanken. Ich wünsche Chien Hoàng, Anika Glasenapp, Christine Blum, Annemarie Glöckner, Christian Falter, Claudia Zwikowics, Marcel Naumann und Björn Sode viel Erfolg mit ihren Doktorarbeiten und in ihrem weiteren Leben.

Dr. Marike Boenisch und Dr. Peter Ilgen wünsche ich die besten mikroskopischen Bilder der Welt. Dr. Van Nguyen wünsche ich einen wundervollen (2.) Forschungsaufenthalt in Hamburg. Ich möchte mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppen Schäfer und Voigt bedanken, die ich in meiner Aufzählung vergessen habe.

Mein letzter Dank geht an meine Eltern, die mir immer Rückhalt und Unterstützung gegeben haben. Ich möchte mich auch bei Christin bedanken für die schöne Zeit, die wir hatten.

Vielen Dank Euch allen!