

**Transkriptomgestützte Untersuchung
des frühen Infektionsprozesses
von *Fusarium graminearum* auf Weizen:
Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 im Vergleich**

Dissertation

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

vorgelegt von

Michael Mentges

geb. 13.05.1988 in Hamburg

Hamburg, August 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Fachbereich Molekulare Phytopathologie, Fakultät der Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Universität Hamburg.

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Streit

Fachbereich Mikrobiologie und Biotechnologie, Fakultät der Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Universität Hamburg.

Vorsitzende der Prüfungskommission: Prof. Dr. Sigrun Reumann

Datum der Disputation: 28. Februar 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	VII
Abstract	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Der phytopathogene Ascomycet <i>Fusarium graminearum</i>	1
1.2 Der Infektionsprozess von <i>F. graminearum</i> auf Weizen.....	2
1.3 Die Wahrnehmung und Weiterleitung von Signalen.....	5
1.3.1 Der G-Protein-Signalweg	5
1.3.2 Der MAP-Kinase Signalweg	8
1.4 Die <i>Gibberella</i> Pathogenitäts-MAP-Kinase Gpmk1.....	9
1.5 Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Chemikalien und allgemeines Material	11
2.1.2 Synthetische Oligonukleotide (Primer)	11
2.1.3 Vektoren.....	13
2.1.4 Organismen	13
2.1.4.1 Pilze	13
2.1.4.2 Bakterien	14
2.1.4.3 Pflanzen	14
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion-Methoden	14
2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	14
2.2.1.2 Synthese von cDNA aus RNA	15
2.2.1.3 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)	15
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.2.3 Nukleinsäuren-Aufreinigung mittels Silica-Säulen	17
2.2.4 Ligation von DNA in Vektoren	17
2.2.5 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	17

2.2.6	Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA	18
2.2.8	Restriktionsverdau durch Endonukleasen	19
2.2.9	Fällung von Nukleinsäuren mittels Isopropanol	19
2.2.10	DNA-Rekombination durch Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.2.11	Plasmid-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.2.12	Protoplasten-Transformation von <i>Fusarium graminearum</i>	21
2.2.13	Kultivierung von <i>Fusarium graminearum</i>	24
2.2.14	Isolation genomischer DNA aus <i>Fusarium graminearum</i> und Weizen	25
2.2.14.1	DNA-Isolation mit CTAB-Lysepuffer.....	25
2.2.14.2	Präparation von Myzel zur Direkt-PCR	25
2.2.15	RNA-Isolation aus <i>Fusarium graminearum</i> und Weizen	26
2.2.16	Southern-Blot-Analyse	26
2.2.16.1	Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran.....	27
2.2.16.2	Prähybridisierung und Hybridisierung	27
2.2.16.3	Detektion	28
2.2.17	Infektion von <i>Triticum aestivum</i> L. durch <i>Fusarium graminearum</i>	28
2.2.17.1	Infektion von Weizenähren	28
2.2.17.2	Infektion von präparierten Weizenblüten.....	28
2.2.18	Wachstumsstudie unter induziertem Stress.....	29
2.2.19	Färbung von <i>Fusarium graminearum</i> mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT).....	29
2.2.20	Quantifizierung von Deoxynivalenol (DON)	30
2.2.21	Analysen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	30
2.2.22	Erstellung der cDNA-Banken (Transkriptome).....	31
2.2.22.1	Präparation der Proben	31
2.2.22.2	Isolation von mRNA.....	32
2.2.22.3	Synthese der Erst-Strang cDNA	32
2.2.22.4	Long Distance PCR (LD-PCR).....	33
2.2.22.5	Aufreinigung und Finalisierung der doppelsträngiger cDNA-Banken.....	33
2.2.22.6	Illumina-Sequenzierung der ds cDNA-Banken und Zuordnung der RNA-Seq-Daten zum Referenzgenom von <i>F. graminearum</i>	34

2.2.23	Bioinformatische Aufarbeitung der Transkriptom-Daten	34
3.	Ergebnisse.....	36
3.1	Mutanten-Erstellung: ΔGpmk1 im Wildtyp 8/1 DsRed	36
3.1.1	Deletion der Gpmk1 (FGSG_06385) im Wildtyp 8/1	36
3.1.2	Analyse der Gpmk1-Deletionsmutante Δ Gpmk1	37
3.2	Präparation der cDNA-Banken des Wildtyps 8/1 und der ΔGpmk1	40
3.2.1	Isolation des Pilzmaterials von infizierten Weizen-Paleae mittels LCM.....	40
3.2.2	Generation der doppelstrang cDNA-Banken durch LD-PCR.....	40
3.3	Differenzielle Expressionsanalyse von Infektionskissen, Laufhyphen und axenischer Kultur (Myzel) der <i>Fusarium graminearum</i> Mutanten Wildtyp 8/1 DsRed und ΔGpmk1 (Transkriptom-Analyse)	43
3.3.1	Sequenzierung und initiale bioinformatische Aufbereitung	43
3.3.1.1	Aufarbeitung der sequenzierten DNA-Abschnitte.....	43
3.3.1.2	Korrelation der sequenzierten Proben/Replikate	43
3.3.2	Genregulation während des frühen Infektionsprozesses auf Weizen.....	44
3.3.2.1	Grundsätzliche Transkription der Gene von <i>F. graminearum</i>	44
3.3.2.2	Differenzielle Expression der Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	45
3.3.2.3	Pflanzlich bedingte Genregulation während der Infektion (pflanzen-regulierte Gene)	47
3.3.2.3.1	Funktionale Kategorisierung der pflanzen-regulierten Genexpression.....	48
3.3.2.3.2	Transkriptionsmuster der pflanzen-regulierten Geneexpression.....	51
3.3.2.4	Regulation der Gene und die Funktion der codierten Proteine von <i>F. graminearum</i> Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1	54
3.3.2.4.1	Funktionsbezogene Transkriptionsmuster der Gene von Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 in individueller Betrachtung	54
3.3.2.4.2	Vergleichende Analyse der Genregulation in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	57
3.3.2.4.3	Funktionsbezogene Transkriptionsmuster der Gene von Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 in komparativer Betrachtung.....	58
3.3.2.4.4	Funktionsbezogene Transkriptionsmuster hochregulierter Gene in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1	63
3.3.2.4.5	Regulation des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	79

3.4 Erstellung und Charakterisierung verschiedener Mutanten von Kandidatengenomen, abgeleitet aus der differentiellen Transkriptomanalyse.....	80
3.4.1 Das gEgh16 Protein FGSG_00006.....	82
3.4.1.1 Charakterisierung der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006	82
3.4.1.1.1 Deletion des gEgh16 Proteins FGSG_00006 im Wildtyp 8/1	82
3.4.1.1.2 Infektionsstudie mit der Δ_{WT} FGSG_00006 auf Weizen	84
3.4.1.1.3 Asexuelle Reproduktion der Δ_{WT} FGSG_00006.....	86
3.4.1.1.4 Die Δ_{WT} FGSG_00006 unter osmotischem und oxidativem Stress	87
3.4.1.1.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der Δ_{WT} FGSG_00006	90
3.4.1.1.6 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Infektion von Weizenpaleae durch die Δ_{WT} FGSG_00006	91
3.4.1.2 Charakterisierung der Überexpressionsmutanten im Wildtyp 8/1 und $\Delta Gpmk1$	94
3.4.1.2.1 Überexpression des gEgh16 Proteins FGSG_00006 in Wildtyp 8/1 und $\Delta Gpmk1$	94
3.4.1.2.2 Infektionsstudie mit der OE_{WT} FGSG_00006 und $OE_{\Delta G}$ FGSG_00006 auf Weizen.....	95
3.4.1.2.3 Asexuelle Reproduktion der OE_{WT} FGSG_00006 und $OE_{\Delta G}$ FGSG_00006	97
3.4.1.2.4 Die OE_{WT} FGSG_00006 und $OE_{\Delta G}$ FGSG_00006 unter osmotischem und oxidativem Stress.....	98
3.4.1.2.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der OE_{WT} FGSG_00006 und $OE_{\Delta G}$ FGSG_00006	102
3.4.1.2.6 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Infektion von Weizenpaleae durch die OE_{WT} FGSG_00006.....	104
3.4.2 Die Regulatoren der Trichothecen-Biosynthese TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538).....	107
3.4.2.1 Charakterisierung der Überexpressionsmutanten in der $\Delta Gpmk1$	107
3.4.2.1.1 Überexpression des TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538) in der $\Delta Gpmk1$	107
3.4.2.1.2 Infektionsstudie mit der $OE_{\Delta G}$ FGSG_03538 und $OE_{\Delta G}$ FGSG_16251 auf Weizen.....	109

3.4.2.1.3	Asexuelle Reproduktion der OE _{ΔG} FGSG_03538 und OE _{ΔG} FGSG_16251	111
3.4.2.1.4	Die OE _{ΔG} FGSG_03538 und OE _{ΔG} FGSG_16251 unter osmotischem und oxidativem Stress.....	111
3.4.2.1.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der OE _{ΔG} FGSG_03538 und OE _{ΔG} FGSG_16251.....	117
3.4.2.1.6	Synthese von Deoxynivalenol während der Infektion von Weizen durch die Mutanten OE _{ΔG} FGSG_03538 und OE _{ΔG} FGSG_16251.....	118
3.4.2.1.7	Transkriptionsprofil des Sekundärmetabolit-Clusters der Deoxynivalenol-Biosynthese in OE _{ΔG} FGSG_03538 und OE _{ΔG} FGSG_16251 im Myzel und während der Infektion von Weizen	119
3.4.3	Die putativen Effektorproteine FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514	126
3.4.3.1	Charakterisierung der Deletionsmutanten im Wildtyp 8/1.....	126
3.4.3.1.1	Deletion der putativen Effektorproteine FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514 im Wildtyp 8/1	126
3.4.3.1.2	Infektionsstudie mit den Effektor-Deletionsmutanten Δ _{WT} FGSG_02685, Δ _{WT} FGSG_07026, Δ _{WT} FGSG_11047 und Δ _{WT} FGSG_12514 auf Weizen	128
3.4.4	Die Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597)	129
3.4.4.1	Charakterisierung der Überexpressionsmutanten im Wildtyp 8/1.....	129
3.4.4.1.1	Überexpression der Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597) im Wildtyp 8/1.....	129
3.4.4.1.2	Infektionsstudie mit der OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620 auf Weizen.....	131
3.4.4.1.3	Asexuelle Reproduktion der OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620	134
3.4.4.1.4	Die OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620 unter osmotischem und oxidativem Stress.....	134
3.4.4.1.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620	139
3.4.4.1.6	Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Infektion von Weizenpaleae durch die OE _{WT} FGSG_03597.....	141

4. Diskussion.....	144
4.1 Auswertung der Transkriptom-Daten des Wildtyps 8/1 und der ΔGpmk1	144
4.1.1 Numerische Analyse der Transkriptom-Daten	144
4.1.1.1 Einführung und generelle Expression der Gene.....	144
4.1.1.2 Pflanzen-regulierte Expression (NPR, PR, PI)	145
4.1.1.3 DEG im Wildtyp 8/1 und in der Δ Gpmk1 sowie deren Vergleich	147
4.2 Funktionelle Kategorisierung der DEG in Wildtyp 8/1 und ΔGpmk1	149
4.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	149
4.2.2 Dehydrogenasen.....	152
4.2.3 Transporterproteine.....	153
4.2.4 Transkriptionsfaktoren.....	155
4.2.5 Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies.....	158
4.2.6 Effektorproteine und Lipasen.....	163
4.2.7 Kohlenhydrataktive Enzyme	166
4.3 Charakterisierung der erstellten Mutanten.....	168
4.3.1 Überexpression der Transkriptionsfaktoren TRI6 und TRI10 in der Δ Gpmk1 ...	168
4.3.2 Deletion von vier putativen Effektorproteinen im Wildtyp 8/1	173
4.3.3 Deletion und Überexpression eines Proteins der gEgh16-Familie im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1	174
4.3.4 Überexpression der Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA und FgFlbB im Wildtyp 8/1	178
4.4 Fazit	182
5. Literatur	183
6. Abkürzungsverzeichnis	XI
7. Abbildungsverzeichnis	XV
8. Tabellenverzeichnis	XVIII
9. Anhang.....	XIX
Danksagung.....	XXI
Eidesstattliche Versicherung	XXII

Zusammenfassung

Der phytopathogene Ascomycet *Fusarium graminearum* befällt verschiedene wirtschaftlich genutzte Gräser wie Weizen, Gerste oder Mais. Dies führt zu erheblichen Verlusten durch Verringerung des Ernteertrags, da die Infektion zu einer Kontamination mit Mykotoxinen führt. Daher ist die Erforschung des Infektionsprozesses von *F. graminearum* von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurde dafür ein transkriptomgestützter Ansatz zum Vergleich des Wildtyps 8/1 und einer avirulenten Deletionsmutante der *Gibberella* Pathogenitäts-MAP-Kinase „ΔGpmk1“ von *F. graminearum* gewählt.

Zunächst wurde hierfür Pilzmaterial von infizierten Weizenspelzen mittels Laser Capture Mikrodissektion isoliert. So wurden separat die nicht-invasiven Laufhyphen, welche zur Besiedlung der Pflanzenoberfläche dienen, und die komplexen mehrzelligen Infektionskissen, die vom Pilz für die mehrfache Penetration der pflanzlichen Zelle eingesetzt werden, gesammelt. Ebenfalls wurde Material einer axenisch angezogenen Myzelkultur für die folgende Analyse geerntet.

Das Material der drei verschiedenen Zelltypen des Wildtyps 8/1 und der ΔGpmk1 wurde zur Erstellung von doppelsträngigen cDNA-Banken eingesetzt. Diese wurden anschließend mittels Illumina-Verfahren sequenziert und bioinformatisch ausgewertet.

Die 13826 Gene von *F. graminearum* wurden anhand ihrer Regulation in paarweisen Vergleichen der Proben und ihrer Funktion eingeteilt. Dies zeigte maßgebliche Unterschiede in der Transkription verschiedener Gene, insbesondere in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der ΔGpmk1. Es konnten insgesamt sieben funktionelle Kategorien identifiziert werden, denen ein hoher Anteil durch differentiell regulierte Gene codierte Proteine angehörten. Diese Gruppen waren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Dehydrogenasen, Transporterproteine, Transkriptionsfaktoren, Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, putative Effektorproteine und kohlenhydrataktive Enzyme.

Durch den durchgeführten Vergleich konnten neun Kandidatengene ausgewählt werden, die in dieser Arbeit näher molekularbiologisch charakterisiert werden sollten. Hierfür wurden Deletions- und Überexpressionsmutanten dieser Gene im Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 erstellt.

Die individuelle Überexpression der beiden Regulatoren TRI6 und TRI10 des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecene-Biosynthese in der ΔGpmk1 zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Während die verstärkte Expression des TRI10 nur einen Effekt auf die Regulation eines Teils der Gene des Clusters besaß, führte die Überexpression des TRI6 unter anderem zu einer wiederhergestellten Deoxynivalenol-Synthese und gesteigerten Virulenz der ΔGpmk1.

Die Deletion von vier in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 hochregulierten putativen Effektorproteinen konnte keinen Effekt auf die Virulenz von *F. graminearum* auslösen.

Die Untersuchung eines gEgh16-ähnlichen Proteins zeigte, dass dieses einen erheblichen Einfluss auf die Pathogenität des Pilzes hat. Die Ausschaltung des codierenden Gens führte zu einer deutlich gesteigerten Virulenz auf einem nahezu infektionsresistenten Weizenkultivar. Eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung infizierter Weizenspelzen zeigte, dass die Frequenz, mit der Infektionsstrukturen gebildet werden, und die Größe dieser Strukturen bei der Mutante deutlich erhöht waren. Die Überexpression des Gens löste hingegen eine starke Begrenzung der Infektion von Weizen aus. Die nähere Untersuchung zeigte, dass die Entwicklung von Infektionsstrukturen bei dieser Mutante unter den getesteten Bedingungen nicht mehr stattfand.

Zur Charakterisierung zweier Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA und FgFlbB wurden diese im Wildtyp 8/1 überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine das vegetative Wachstum unter osmotischem und oxidativem Stress beeinflussen. Allerdings hatte nur FgFlbA einen Effekt auf die asexuelle Reproduktion des Pilzes. Das Protein FgFlbB besaß hingegen einen deutlichen Einfluss auf die Virulenz von *F. graminearum*. Die Überexpression löste eine Hypervirulenz auf dem resistenten Weizenkultivar aus. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des durch die Mutante infizierten Pflanzenmaterials zeigte im Vergleich zum Wildtyp 8/1 ein wesentlich dichteres Laufhyphennetzwerk sowie stark vergrößerte Infektionsstrukturen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sich der Wildtyp 8/1 und die Δ Gpmk1 auf transkriptioneller Ebene deutlich unterscheiden. Die Avirulenz der Deletionsmutante ist daher nicht auf die fehlerhafte Transkription weniger einzelner Gene, sondern einer grundlegenden Änderung des gesamten Transkriptionsprofils zurückzuführen. Dennoch konnte der transkriptomgestützte Vergleich des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 zur Identifizierung einzelner Gene mit einem Bezug zur Pathogenität von *F. graminearum* herangezogen werden.

Abstract

The phytopathogenic ascomycete *Fusarium graminearum* infects various economically used grasses such as wheat, barley or corn. This results in significant losses by reducing crop yield as the infection leads to contamination with mycotoxins. Therefore, the study of the infection process of *F. graminearum* is of great interest.

In this work, a transcriptome-based approach was used to compare wild-type 8/1 and an avirulent deletion mutant of the *Gibberella* pathogenicity MAP kinase " Δ Gpmk1" of *F. graminearum*.

First, fungal material was isolated from infected wheat husks by laser capture microdissection. Separately, non-invasive runner hyphae, used to colonize the plant surface, and the complex multicellular infection cushions, formed by the fungus for multiple penetration events of the plant cell, were collected. Also material of axenically cultivated mycelium culture was harvested for the following analysis.

The material of the three different wild-type 8/1 and Δ Gpmk1 cell types was used to construct double-stranded cDNA libraries. These were then sequenced by Illumina method and analyzed bioinformatically.

The 13826 genes of *F. graminearum* were classified by their regulation in pairwise comparisons of the samples as well as by their function. This showed significant differences in the transcription of various genes, in particular in the infection cushions of the wild-type 8/1 and the Δ Gpmk1. A total of seven functional categories were identified, which included a high proportion of proteins encoded by differentially regulated genes. These groups were G protein-coupled receptors, dehydrogenases, transporter proteins, transcription factors, proteins related to reactive oxygen species, putative effector proteins, and carbohydrate-active enzymes.

The comparison made it possible to select nine candidate genes, which should be further characterized by molecular biological methods. For this purpose, deletion and overexpression mutants of these genes were generated in wild type 8/1 and the Δ Gpmk1.

Individual overexpression of the two regulators TRI6 and TRI10 of the secondary metabolite cluster of trichothecene biosynthesis in the Δ Gpmk1 showed different results. While the increased expression of TRI10 had only an effect on the regulation of part of the cluster genes, the overexpression of TRI6 led inter alia to a restored deoxynivalenol synthesis and increased virulence of the Δ Gpmk1.

The deletion of four putative effector proteins upregulated in the wild type 8/1 infection cushions failed to induce any effect on the virulence of *F. graminearum*.

Examination of a gEgh16-like protein showed that it has a significant influence on the pathogenicity of the fungus. The deletion of the encoding gene led to a significantly increased virulence on a nearly infection-resistant wheat cultivar.

A fluorescence microscopic examination of infected wheat floret leaves showed that the frequency with which infection structures are formed and the size of these structures were significantly increased in the mutant. In contrast, overexpression of the gene causes a strong reduction of the infection on wheat. Closer examination showed that the development of infection structures no longer took place under the conditions tested in this mutant.

To characterize the two regulators of G protein signaling FgFlbA and FgFlbB, these were overexpressed in wild type 8/1. It could be shown that both proteins influence vegetative growth under osmotic and oxidative stress. Only the expression of FgFlbA had an effect on the asexual reproduction of the fungus. The protein FgFlbB, however, had a significant influence on the virulence of *F. graminearum*. The overexpression caused hypervirulence on the resistant wheat cultivar. A fluorescence microscopic examination of the plant material infected by the mutant showed a much denser network of runner hyphae compared to the wild type 8/1 as well as greatly enlarged infection structures.

Taken together, these results show that the wild-type 8/1 and the Δ Gpmk1 differ significantly at the transcriptional level. The avirulence of the deletion mutant is therefore not due to the erroneous transcription of a few individual genes, but a fundamental change in the entire transcriptional profile. Nevertheless, the transcriptome-based comparison of wild-type 8/1 and Δ Gpmk1 could be used to identify individual genes related to the pathogenicity of *F. graminearum*.

1. Einleitung

1.1 Der phytopathogene Ascomycet *Fusarium graminearum*

Der Pilz *Fusarium graminearum* ist die Anamorphe von *Gibberella zeae* und gehört zu den Ascomyceten (Echte Schlauchpilze). Er ist ein vor allem in gemäßigten und subtropischen Zonen verbreiteter fakultativer Parasit und nutzt als Saprophyt abgestorbenes Pflanzenmaterial oder als Perthophyt lebende Pflanzen als Nährstoffquelle.

Zu seinen möglichen Wirten als Phytopathogen gehören überwiegend monokotyle Nutzpflanzen wie Weizen (*Triticum* spp.), Gerste (*Hordeum* spp.), Hafer (*Avena* spp.), Reis (*Oryza* spp.) und Mais (*Zea* spp.) (Babadoost, 2018). Allerdings können auch andere Pflanzenarten als Träger für *F. graminearum* dienen, diese weisen bei einer Infektion meist keine Krankheitssymptome auf (Goswami & Kistler, 2004).

Die Verbreitung von *F. graminearum* erfolgt über Ascosporen (sexuelle Sporen), welche in den namensgebenden Asci gebildet werden, oder Makrokonidien (asexuelle Sporen), die an umgebildeten Hyphen, den Konidiophoren (Abb. 1A), gebildet werden (Pritsch et al., 2000). Für eine Infektion werden die Sporen durch Wind oder Regen von bereits infizierten Pflanzen und Pflanzenresten im Erdreich zu den Wirtspflanzen transportiert. Die Infektion kann zu einer Ähren-, Halm- oder Wurzelfäule führen und wird als Fusariose bezeichnet.

Unter Laborbedingungen breitet sich *F. graminearum* in einer Reinkultur in Form eines filamentösen Myzels aus (Abb. 1B).

Der Befall einer Weizenähre wird auch „*Fusarium* Head Blight“ (FHB) bzw. Ährenbleiche genannt und äußert sich in einem frühzeitigen Ausbleichen der Ähre (Abb. 1C). Die Infektion auf Mais löst die sogenannte Kolbenfäule aus (Abb. 1D). In jedem Fall führt eine Infektion zu einer Anreicherung von Mykotoxinen in der Frucht (Bakker et al., 2018; Bertero et al., 2018). Durch Fusariosen entstehen weltweit wirtschaftliche Schäden von mehreren Milliarden US-Dollar, da das Erntegut aufgrund einer hohen Belastung durch Mykotoxine nicht weiterverwertet werden kann (Duveiller et al., 2007).

Die von *F. graminearum* synthetisierten Mykotoxine wirken nicht nur auf das befallene Pflanzenmaterial, sondern haben auch eine Wirkung auf Mensch und Tier, die infizierte Pflanzenteile zu sich nehmen.

Eine besonders für *Fusarium* spp. charakteristische Gruppe der Mykotoxine sind die Trichothecene (Bakker et al., 2018). Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise Deoxynivalenol (DON). Die Einnahme von DON kann unter anderem zu Erbrechen, Störungen des Immunsystems, reduzierter Nahrungsaufnahme und Gewichtsverlust bei Tieren führen (Pestka & Dong, 1994; Prelusky et al., 1994; Antonissen et al., 2014).

Zudem spielt es eine entscheidende Rolle bei der frühen Infektion der Wirtspflanze und wird in den Infektionsstrukturen von *F. graminearum* vermehrt synthetisiert (Proctor et al., 1995; Maier et al., 2006; Boenisch & Schäfer, 2011).

Ein weiteres produziertes Mykotoxin ist Zearalenon (ZEA). Es besitzt eine östrogenartige Wirkung und kann so ernste Schäden der Reproduktion und Fruchtbarkeit verursachen (Kowalska et al., 2016).

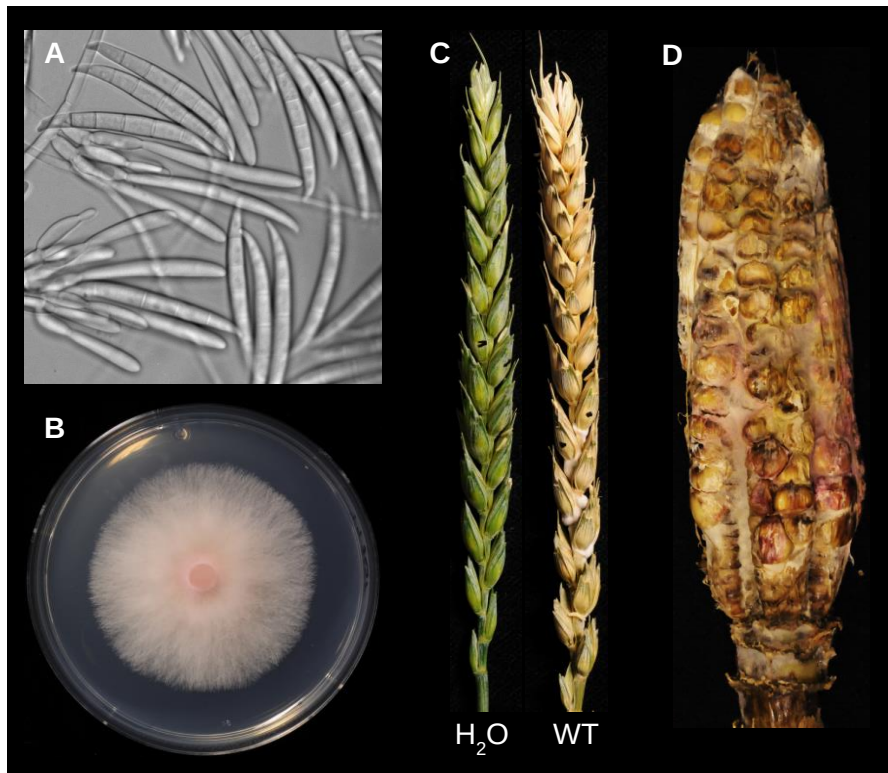


Abb. 1: Entwicklungsformen des *F. graminearum* Wildtyps 8/1. **A:** Konidien und Konidiophore. Mikroskopische Aufnahme von neu gebildeten Konidien und Konidiophoren. **B:** Myzelkultur auf Festmedium. Reinkultur auf Vollmedium-Agar nach 3 Tagen. **C:** Symptomatik der Ährenfusariose auf Weizen. Infektionsfortschritt von *F. graminearum* auf einer Weizenähre nach 21 Tagen (rechte Ähre, WT) und eine uninfizierte Vergleichsähre (links, H₂O). **D:** Symptomatik der Kolbenfäule auf Mais. Infektion eines Maiskolbens durch *F. graminearum* nach 21 Tagen. Die Aufnahmen wurden teilweise bereitgestellt von Dr. Jörg Bormann, Universität Hamburg.

1.2 Der Infektionsprozess von *F. graminearum* auf Weizen

Während der Infektion von pflanzlichem Gewebe durchläuft *F. graminearum* verschiedene Entwicklungsphasen und bildet unter anderem spezialisierte Hyphen, welche zur Penetration der Pflanzenoberfläche und somit zur Ausbreitung auf und innerhalb der Pflanze dienen.

In der ersten Phase der Infektion von Blütenorganen des Weizens, wie Hüllspelzen (Glumae), Deckspelzen (Lemmae) und Vorspelzen (Paleae), entwickelt sich ein dichtes, gleichmäßiges, das pflanzliche Gewebe überspannendes Netzwerk aus sogenannten Laufhyphen (Abb. 2A) (Huang et al., 2008; Boenisch & Schäfer, 2011). Dieser Prozess beginnt nach etwa sechs bis zwölf Stunden mit dem Auskeimen der sich in der Blüte befindenden Konidien und ist nach etwa vier bis fünf Tagen abgeschlossen (Boenisch & Schäfer, 2011).

Während der Besiedlung der Pflanzenoberfläche und im Erdboden besteht ein Kontakt von *F. graminearum* mit verschiedenen anderen Organismen. Diese Interaktion kann sich negativ auf das Wachstum des Pilzes auswirken (Johnson et al., 2005; Boddy et al., 2010; Haack et al., 2016). Daher hat *F. graminearum* verschiedene Mechanismen entwickelt diesem entgegen zu wirken. Die Sekretion verschiedener Sekundärmetabolite ist dabei eine Maßnahme (Malz, 2004; Glasenapp, 2017; Xu et al., 2019). Zu jener Gruppe gehören beispielsweise Polyketide wie das Pigment Aurofusarin (AUR). Dieses entfaltet eine inhibitorische Wirkung auf verschiedene gram-positive Bakterien und Pilze (Malz, 2004; Glasenapp, 2017). AUR zeigt aber auch eine abstoßende Wirkung auf Fressfeinde wie Springschwänze (*Folsomia candida*), Asseln (*Trichorhina tomentosa*) und Larven des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*) (Xu et al., 2019). Es stärkt somit die Position von *F. graminearum* im kompetitiven Umfeld der frühen Besiedlungsphase der Wirtspflanze. In diesem Zeitraum treten noch keine Krankheitssymptome der Pflanze auf; diese zeigen sich erst in der folgenden zweiten Phase der Infektion.

In Phase II beginnen sich die Laufhyphen zu verzweigen und zu differenzieren. Als Folge werden die drei bisher identifizierten Infektionsstrukturen gebildet. Die ersten und strukturell einfachsten sind dabei die Fuß-Strukturen. Sie bestehen aus kurzen Seitenhyphen, welche dicht an der Pflanzenoberfläche eine füzchenartige Verdickung aufweisen (Abb. 2B).

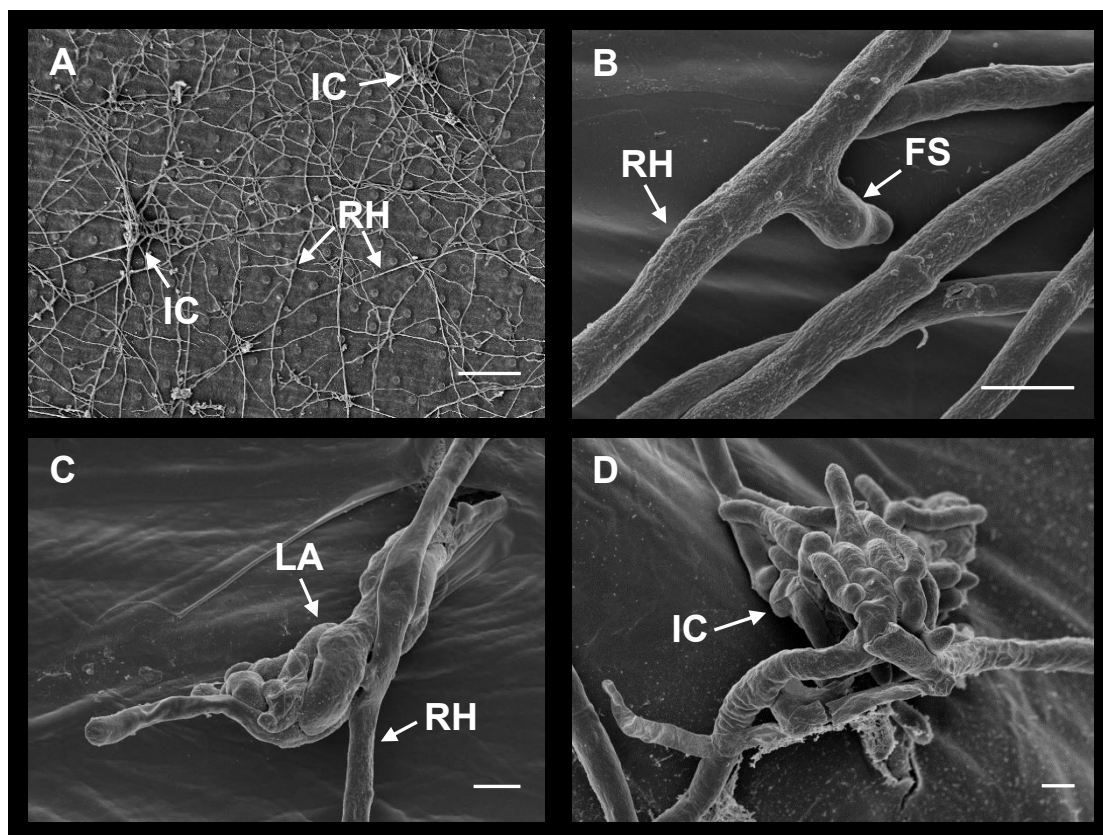


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Infektionsstrukturen von *F. graminearum* auf Weizen. Die Infektion wurde auf Vorspelzen mit dem Wildtyp 8/1 durchgeführt und 11 Tage nach der Inokulation dokumentiert. **A:** Laufhyphen-Netzwerk und Infektionskissen, Maßstab = 100 µm. **B-D:** Maßstab = 3 µm. **B:** Fuß-Struktur. **C:** Gelapptes Appressorium. **D:** Infektionskissen. Abkürzungen: IC: Infektionskissen; RH: Laufhyphne; FS: Fuß-Struktur; LA: Gelapptes Appressorium.

Seitenhyphen können sich durch weitere Verzweigung und Aggregation auch zu den komplexeren Infektionsstrukturen, den gelappten Appressorien (Abb. 2C) und Infektionskissen (Abb. 2D), entwickeln (Emmett & Parbery, 1975; Huang et al., 2008; Boenisch & Schäfer, 2011).

Diese Strukturen, und insbesondere die Infektionskissen, sind dabei Stätten der direkten aggressiven und defensiven Interaktion zwischen *F. graminearum* und der Wirtspflanze. Daher sind sowohl die Transkription der Gene als auch die Expression der codierten Proteine von *F. graminearum* stark an diese Wechselwirkung angepasst (Lysøe et al., 2011; Zhang et al., 2012; Boedi et al., 2016; Brown et al., 2017). Unmittelbar unter den Infektionskissen beginnt der Abbau der pflanzlichen Struktur, welcher sich durch das Absterben des Pflanzengewebes äußert. Daher findet in den Infektionsstrukturen eine vermehrte Expression von Proteinen, welche, wie Lipasen oder kohlenhydrataktive Enzyme (CAZy), in einer Verbindung mit lytischen Prozessen stehen, statt (Brown et al., 2012, 2017; Zhang et al., 2016). Die CAZy gehören dabei verschiedenen Enzym-Familien an, die an der Verknüpfung oder dem Abbau von Polysacchariden beteiligt sind. Zu diesen zählen unter anderem verschiedene Cellulasen, Xylanasen und Cutinasen, welche an der Degeneration der pflanzlichen Zelle beteiligt sind (Lombard et al., 2014).

Als nekrotropher Organismus versucht *F. graminearum* die Wirtspflanze durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktiv zu schädigen. Dies sind hochreaktive Formen des Sauerstoffs, wie Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale oder Superoxid-Anionen, die beispielsweise Schäden in Proteinen oder DNA-Sequenzen auslösen können.

Ein Teil dieses Mechanismus ist es die durch den Befall induzierte hypersensitive Reaktion (HR) zu kompensieren und gegen die Pflanze selbst einzusetzen. Die HR bewirkt ein schnelles Absterben aller Pflanzenzellen in der Umgebung einer Infektion und dient so theoretisch der Eingrenzung eines Pathogens durch Limitierung der Nährstoffe (Bashir et al., 2013). Der induzierte Zelltod wirkt sich dabei größtenteils auf eine Infektion durch biotrophe Pathogene aus und hat einen potentiell förderlichen Einfluss auf die Ausbreitung eines nekrotrophen Pathogens, wie *F. graminearum*.

Ein entscheidender Teil der HR ist der sogenannte „oxidative Burst“, welcher eine schnelle Akkumulation von ROS im Pflanzengewebe bezeichnet. Er dient der Kontrolle des gezielt ausgelösten Absterbens der pflanzlichen Zellen (Jabs et al., 1996).

F. graminearum bildet dagegen Proteine die speziell in Verbindung zu ROS stehen (RRE). Zu diesen gehören Superoxid-Dismutasen (SOD) und Peroxidasen, welche gemeinsam der Detoxifikation von ROS dienen und so die Wirkung des oxidativen Bursts auf den Pilz abschwächen. Die SOD stehen dabei vor den Peroxidasen im Reaktionsverlauf (Fridovich, 1995; Yao et al., 2016).

Eine weitere Gruppe von RRE sind Monooxygenasen. Sie nehmen Funktionen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse ein und sind somit Teil der Synthese verschiedener Sekundärmetabolite (u. a. AUR und DON), dem Abbau pflanzlichen Materials und der Detoxifikation von für den Pilz schädlicher Pflanzenstoffe, wie Phytoalexinen (Frandsen et al., 2011; Isaksen et al., 2014; Pigné et al., 2017; Villafana et al., 2019).

Ein weiteres Interaktionskonzept zwischen der Wirtspflanze und *F. graminearum* umfasst die Sekretion und Wahrnehmung diverser Effektorproteine durch beide Organismen. Diese dienen jeweils zur negativen Beeinflussung des anderen Interaktionspartners oder, auf der Seite des Angreifers, der Maskierung der Infektion (Tan et al., 2010; Misas Villamil et al., 2019). Diese Beziehung ist hochgradig aufeinander abgestimmt und hat großen Einfluss auf die Wirtsspezifität eines Pathogens (Jones & Dangl, 2006). Zusammengefasst löst die initiale Detektion von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) eine leichte Abwehrreaktion der Pflanze aus. Der Pilz sekretiert darauf Effektorproteine, welche die pflanzliche Abwehr schwächt. Diese Effektoren werden jedoch ihrerseits durch den Wirt erkannt und lösen eine zweite und stärkere Reaktion, wie die bereits beschriebene HR, aus. Dies führt erneut zu einer Ausschüttung anderer Effektorproteine. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis die Infektion der Pflanze erfolgreich war oder das Pathogen erfolgreich abgewehrt werden konnte (Jones & Dangl, 2006).

Alle genannten Proteingruppen dienen dazu, die frühe Infektionsphase von *F. graminearum* zu Gunsten des Pilzes zu beeinflussen und eine erfolgreiche Invasion des pflanzlichen Gewebes zu ermöglichen. Dies leitet auch die dritte und letzte Infektionsphase ein. Während dieser zeigt das gesamte infizierte Pflanzenmaterial deutliche Nekrosen und *F. graminearum* bildet Lufthyphen und Sporodochien (Boenisch & Schäfer, 2011).

1.3 Die Wahrnehmung und Weiterleitung von Signalen

1.3.1 Der G-Protein-Signalweg

Die Wahrnehmung von Reizen aus der Umgebung ist von grundlegender Bedeutung für eine erfolgreiche Infektion von *F. graminearum* und anderen Phytopathogenen. Ohne diese wäre eine Erkennung der Wirtspflanze unmöglich und Entwicklungsprozesse, wie die Bildung der Infektionsstrukturen oder Produktion benötigter Enzyme, könnten nicht eingeleitet werden (Hicks, 1997; Yu et al., 2008; Park et al., 2012; Martín et al., 2019).

Für die Aufnahme von Reizen und der initialen Aktivierung und Weiterleitung eines zellinternen Signals werden G-Proteine und an diese gekoppelte Rezeptoren eingesetzt (Abb. 3). Jedes G-Protein besteht aus drei Untereinheiten ($G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$), welche im inaktivierten Zustand in einem Heterotrimer an der Plasmamembran und einem Rezeptorprotein angelagert sind (Neves et al., 2002).

Wenn ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) einen Aktivator (Liganden) wahrnimmt, führt dies zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, so dass dieser als GTP-Austauschfaktor agieren kann (Abb. 3) (Bluhm et al., 2007; Trzaskowski et al., 2012). So kann das an die $G\alpha$ -Untereinheit gebundene GDP durch GTP ersetzt werden, was wiederum zu einer Abspaltung der $G\alpha$ -Untereinheit von dem $G\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer führt (Abb. 3). Sowohl die $G\alpha$ -Untereinheit als auch das $G\beta\gamma$ -Dimer können so zur Regulation von Signalwegen und Prozessen dienen (Neves et al., 2002).

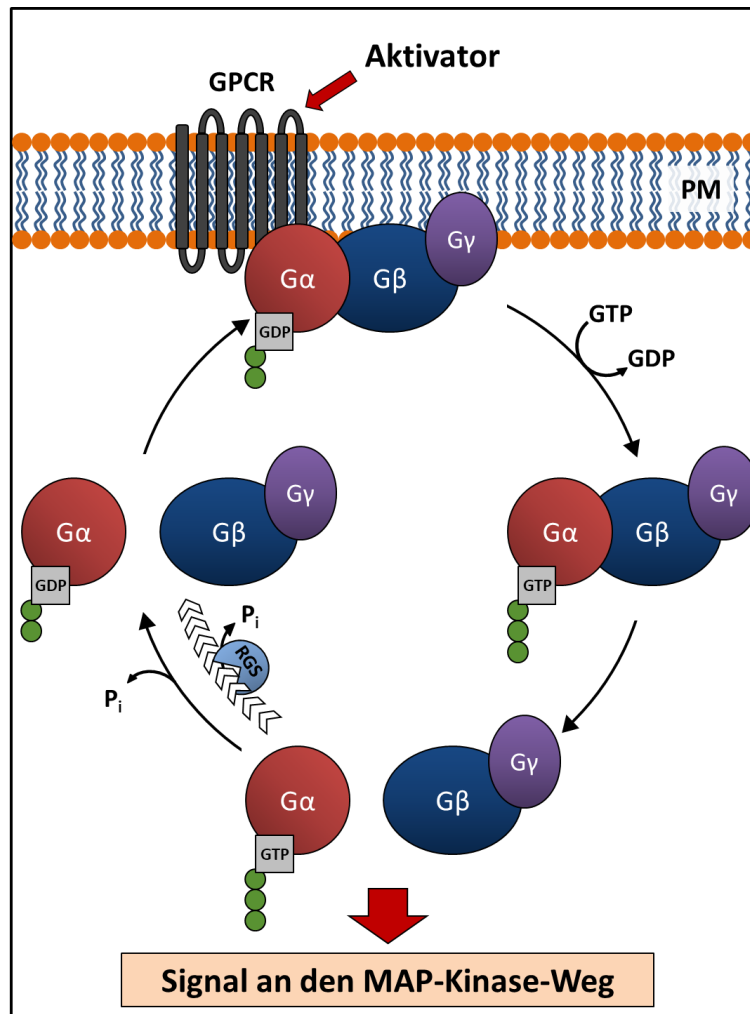


Abb. 3: Zyklus der G-Protein-Aktivierung (nach Li et al., 2007). Die Bindung eines Aktivators an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) in der Plasmamembran (PM) führt zu einem Austausch des an die $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins gebundenen GDP mit einem GTP. Dies führt zu einer Abspaltung der $G\alpha$ -Untereinheit von den $G\beta\gamma$ -Untereinheiten. Durch diesen Prozess können Signale unter anderem an nachgeschaltete MAP-Kinase-Wege weitergeleitet werden. Die Hydrolyse des GTP ermöglicht eine erneute Komplexbildung aller Untereinheiten des G-Proteins. Das G-Protein-Heterotrimer geht somit wieder in den inaktiven Zustand über. Die Hydrolyse des GTP kann von sogenannten Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS) durch Aktivierung der GTPase-Aktivität beschleunigt werden.

In filamentösen Pilzen sind drei verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten bekannt. Die Proteine der Gruppe I werden als $G\alpha_i$ -Untereinheiten bezeichnet und beeinflussen die cAMP-Produktion im Zellinneren negativ (Turner & Borkovich, 1993; Li et al., 2007). In *F. graminearum* zählt das Protein GzGPA1 (FGSG_05535) zu dieser Gruppe der $G\alpha_i$ -Untereinheiten.

Die Expression des GzGPA1 hat Einfluss auf die Biosynthese des Mykotoxins DON (Hicks, 1997; Yu et al., 2008). Der $G\alpha$ -Untereinheiten der Gruppe II sind allgemein weniger stark konserviert (Kays & Borkovich, 2004). Die Funktion dieser Gruppe ist nicht eindeutig und konnte für *F. graminearum* noch nicht ermittelt werden (Yu et al., 2008). Als Gruppe III werden die $G\alpha_s$ -Untereinheiten definiert. Diese besitzen eine Wirkung auf sowohl cAMP-abhängige als auch cAMP-unabhängige Prozesse, dienen im Allgemeinen allerdings der positiven Regulation des zellinternen cAMP-Niveaus (Bölker, 1998; Li et al., 2007). In *F. graminearum* ist das Protein GzGPA2 (FGSG_09414) eine dieser $G\alpha_s$ -Untereinheiten. Ihre Expression ist dabei entscheidend für die vollständige Pathogenität und intakte Zellwandstruktur des Pilzes (Yu et al., 2008).

Die Untereinheiten $G\beta$ und $G\gamma$ werden nicht in verschiedene Gruppen unterteilt. Die funktionelle Untersuchung der einzelnen Untereinheiten legt nahe, dass sie in filamentösen Pilzen im $G\beta\gamma$ -Komplex agieren (Palmer et al., 2006). In *F. graminearum* führt die Störung der Expression einer $G\beta$ -Untereinheit (FGSG_04104) zu einer stark verminderten Virulenz $G\beta$ und einer Veränderung in der Toxin-Biosynthese (Yu et al., 2008).

Eine Funktion, die sowohl von der $G\alpha$ -Untereinheit als auch dem $G\beta\gamma$ -Dimer ausgeübt wird, ist die Weiterleitung eines Signals an den Signalweg der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) (Li et al., 2007).

Nachdem sich die $G\alpha$ -Untereinheit von dem G-Protein Heterotrimer abgespalten hat und die Signal-Kaskade weitergeleitet wurde, wird das an das $G\alpha$ gebundene GTP hydrolysiert und zu GDP. Dieser Vorgang wird durch die geringe GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit katalysiert. Er kann allerdings durch das Eingreifen von sogenannten Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS) erheblich beschleunigt werden (Abb. 3). Durch Bindung an das $G\alpha$ -Protein während der GTP-Hydrolyse wird dieser Prozess erleichtert und kann somit schneller durchgeführt werden (Ross & Wilkie, 2000). RGS gelten daher generell als Inaktivatoren des G-Protein-Signalwegs und somit als Gegenstück zu den GPCR (De Vries et al., 2000). Einer der bedeutendsten RGS ist FlbA in *Aspergillus nidulans* und dessen Paraloge FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597) in *F. graminearum* (Yu et al., 1996; Park et al., 2012).

Ohne das gebundene GTP geht die $G\alpha$ -Untereinheit wieder eine Verbindung mit den beiden übrigen Untereinheiten ein. Das G-Protein-Heterotrimer geht so wieder in den inaktivierten Ausgangszustand über (Abb. 3).

1.3.2 Der MAP-Kinase Signalweg

Wie alle filamentösen Ascomyceten besitzt auch *F. graminearum* das hochkonservierte Signaltransduktions-System der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen, MAPK) (Zhao et al., 2007; Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017). Dieses besteht aus drei aufeinanderfolgenden Protein-Kinasen (MAPKKK, MAPKK und MAPK). Erhält die erste MAPKKK ein Aktivierungssignal, beispielsweise aus dem G-Protein-Signalweg, führt diese eine Phosphorylierungsreaktion der MAPKK aus. Dieses phosphoryliert darauf die letzte MAPK der Kaskade. Nach dieser Aktivierung wechselt die MAPK ihre Position vom Zytoplasma in den Zellkern, wo verschiedene regulatorisch wirkende Faktoren induziert werden können (Zhao et al., 2007; Martínez-Soto & Ruiz-Herrera, 2017). Zu diesen gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren wie FgSte12 (FGSG_07310) aus *F. graminearum* (Gu et al., 2015).

Die drei MAPK in *F. graminearum* sind MG1, FG-OS2 bzw. FgHOG1 und die Gpmk1. Alle nehmen eine wichtige Rolle in der Regulation der Entwicklungsprozesse des Pilzes ein und wirken sich somit auf das Wachstum, die sexuelle und asexuelle Reproduktion, die Reaktion auf verschiedene Stressoren sowie den Infektionsprozess aus (Hou et al., 2002; Jenczmionka et al., 2003; Nguyen et al., 2012).

Die MG1 (FGSG_10313) spielt dabei eine entscheidende Rolle während des vegetativen Wachstums und der Pflanzeninfektion auf Weizen. Eine Deletion der MG1 führt daher zu einer erheblichen Reduktion des Wachstums und einer fast vollständigen Störung des Infektionsprozesses. Diese geht mit der starken, nahezu absoluten Verringerung der produzierten Menge des Mykotoxins DON einher. Des Weiteren löst die Ausschaltung der MG1 eine gesteigerte Anfälligkeit der Zellwand des Pilzes gegenüber lytischen Enzymen sowie generellem Zellwand-Stress aus. Zudem konnte keine Bildung von Anastomosen festgestellt werden, was eine sexuelle Sterilität bedingt (Hou et al., 2002).

Die MAPK FgOS-2 (FGSG_09612), auch als FgHOG1 bezeichnet, zählt zu den Stress-aktivierten Proteinkinasen. Sie ist ebenfalls in das vegetative Wachstum, die asexuelle und sexuelle Vermehrung und die Toxinproduktion von DON involviert (Nguyen et al., 2012; Zheng et al., 2012). Insbesondere ist die FgOS-2 allerdings an der Reaktion und Kompensation von osmotischem Stress beteiligt. Eine Deletion der Proteinkinase führt zu einer nahezu vollständigen Reduktion des Wachstums und erhöhten Salzkonzentrationen (Nguyen et al., 2012). Ebenso wird unter diesen Bedingungen die Keimung von Konidien stark verzögert und kann nicht erfolgreich abgeschlossen werden (Zheng et al., 2012). Die Ausschaltung führt auch zu einer erheblichen Verringerung der Virulenz von *F. graminearum* auf Weizen und Mais (Nguyen et al., 2012; Zheng et al., 2012).

1.4 Die *Gibberella* Pathogenitäts-MAP-Kinase Gpmk1

Die *Gibberella* Pathogenitäts-MAP-Kinase Gpmk1 (FGSG_06385) ist eine der drei MAP-Kinasen in *F. graminearum*. Sie nimmt eine bestimmende Rolle in der Virulenz des Pilzes ein. Die Deletion der Gpmk1 führt zu einem vollständigen Verlust der Pathogenität auf Weizen (Jenczmionka et al., 2003; Urban et al., 2003).

Während des Infektionsprozesses werden nur auf Paleae Infektionsstrukturen gebildet. Auf Glumae ist die Infektion hingegen auf die erste Phase, der Bildung von Laufhyphen, beschränkt (Boenisch, 2013). Unter den Infektionskissen der Gpmk1-Deletionsmutante finden keine Penetrationsereignisse statt. Im Allgemeinen kann nur ein gelegentlich auftretendes subcuticuläres Wachstum der Pilzhyphen beobachtet werden (Abb. 4B). Dieses löst lokal sehr begrenzte Nekrosen des pflanzlichen Gewebes aus (Abb. 4A) (Boenisch, 2013).

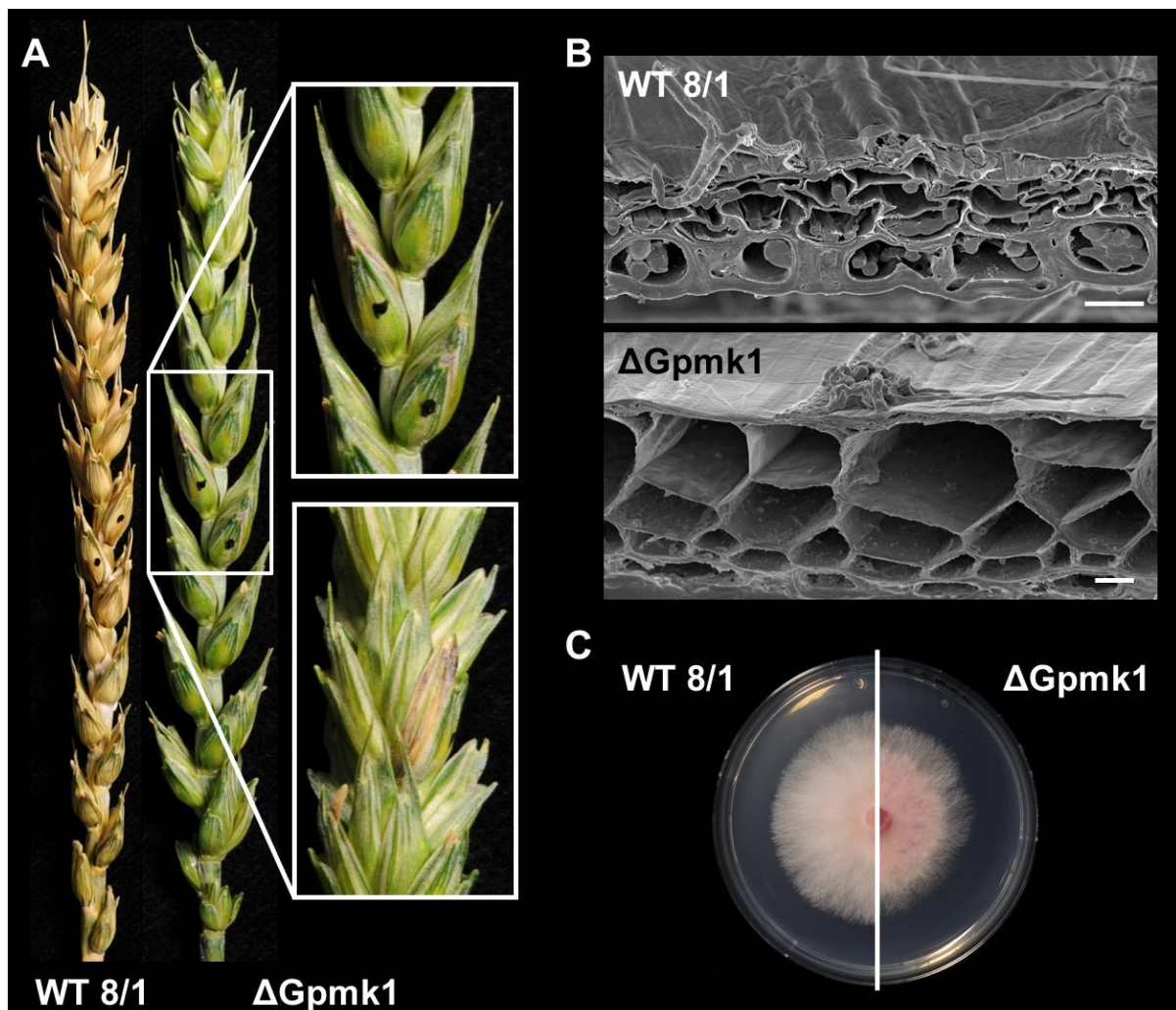


Abb. 4: Vergleich des Wildtyps 8/1 (WT 8/1) und der Deletionsmutante der Gpmk1 (Δ Gpmk1) von *F. graminearum*. **A:** Infektion von Weizenähren durch den Wildtyp 8/1 (links) und die Δ Gpmk1 (rechts). Zudem sind eine vergrößerte Frontalansicht (oben) und Seitenansicht (unten) des mit der Δ Gpmk1 inokulierten Bereichs der Weizenähre. **B:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Querschnitts infizierter Paleae des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1. Oberflächliches und intrazelluläres invasives Wachstum des Wildtyps 8/1 (oben). Oberflächliches Wachstum mit Infektionskissen ohne Penetration der Pflanze sowie ohne invasives Wachstum der Δ Gpmk1 in den Pflanzenzellen (unten) (Kusch, 2014). Maßstab: 10 μ m **C:** Vegetatives Wachstum auf Vollmedium. Die Δ Gpmk1 (rechts) zeigt ein reduziertes Wachstum und eine verstärkte Pigmentierung gegenüber dem Wildtyp 8/1 (links).

Die Gpmk1 ist für die Induktion der Biosynthese des Mykotoxins DON während der Infektion von Weizen von entscheidender Bedeutung, so dass bei einer Ausschaltung der Gpmk1 kein DON produziert wird (Jenczmionka, 2004). Das Sekundärmetabolit Aurofusarin wird hingegen vermehrt in der Deletionsmutante synthetisiert, was sich in einer deutlichen rötlichen Färbung des Myzels in einer Flüssigkultur und einer leichten Färbung einer Kultur auf Festmedium äußert (Abb. 4C). In beiden Fällen handelt es sich um das gleiche Vollmedium.

Auch die sexuelle und asexuelle Reproduktion von *F. graminearum* wird durch die Gpmk1 reguliert. Die Deletion der Gpmk1 führt zu einer etwa verdoppelten Produktion von Konidien in einem flüssigen Induktionsmedium. Allerdings ist die Ausschaltungsmutante steril und bildet keine Perithezien (Jenczmionka et al., 2003; Urban et al., 2003). Auf die Keimungsrate von Konidien hat die Gpmk1 hingegen keinen Einfluss (Jenczmionka et al., 2003).

Das vegetative Wachstum der Deletionsmutante ist um etwa 10 % gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 4C). Auch bewirkt osmotischer Stress bei der Mutante eine stärkere Verringerung des Wachstums als beim Wildtyp.

Die Ausschaltung beeinflusst auch die Aktivität sekretierter Lipasen und kohlenhydrataktiver Enzyme negativ. Im Fall der Lipasen führt eine verminderte Sekretion zu einer erhöhten lipolytischen Aktivität im Inneren der Zellen von *F. graminearum*. Das Fehlen der Gpmk1 verzögert zudem die Induktion sekretierter proteolytischer Enzyme (Jenczmionka & Schäfer, 2004).

1.5 Zielsetzung

Die Untersuchung des Infektionsprozesses von *F. graminearum* ist ein bedeutender Faktor in der aktuellen phytopathologischen Forschung. Daher sollen in dieser Arbeit die Unterschiede zwischen dem voll-pathogenen Wildtyp 8/1 und der avirulenten Deletionsmutante der Gpmk1 herausgearbeitet werden.

Hierfür sollen zunächst Transkriptome einer Myzelkultur sowie von Weizenpaleae isolierter Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Mutante erstellt und miteinander verglichen werden. Die differentielle Genexpression soll Aufschluss über die Relevanz der codierten Proteine für die Infektion geben und potentielle Defizite in der Entwicklung der Gpmk1-Mutante aufzeigen.

Im Anschluss soll die Funktion ausgewählter Gene sowie deren codierte Proteine molekularbiologisch durch Erstellung und Analyse von Deletions- und Überexpressionsmutanten in *F. graminearum* charakterisiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es so weitere Gene und Proteine zu identifizieren, welche die Entwicklung und den Infektionsprozess von *F. graminearum* kontrollieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und allgemeines Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Deutschland), Biozym Scientific (Deutschland), TaKaRa Bio (Japan), Thermo Fisher Scientific (USA), Merck (Deutschland), Promega (USA), Roche Molecular Systems (Schweiz) und Carl Roth (Deutschland) bezogen.

Zur Herstellung von Lösungen und Medien wurde doppelt deionisiertes Wasser (ddH₂O) aus einem „PURELAB flex“ Laborwassersystem der Firma ELGA LabWater (Deutschland) verwendet und wird im Folgenden als H₂O bezeichnet.

Sofern erforderlich, wurden die verwendeten Lösungen, Medien, Gefäße und sonstiges Labormaterial zur Sterilisierung bei 120 °C für 20 Minuten bei 1,2 bar autoklaviert.

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics Germany (Deutschland) synthetisiert. Die Bezeichnung, Sequenz, Anlagerungstemperatur (T_A), die theoretische Produktgröße und der Einsatzzweck sind in den folgenden Tabellen (Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5) aufgeführt:

Tab. 1: Oligonukleotide zur Erstellung der Deletionsmutanten.

Bezeichnung	Sequenz	T _A [°C]	Produkt [bp]	Anwendung
Erstellung von Deletionsmutanten				
Gpmk1_KOK_for	5'- GAC AGC ACG GCC CGA G -3'	62	2538	KO-Konstrukt FGSG_06385 (Gpmk1); Diagnosefragment
Gpmk1_KOK_rev	5'- GCA CTA GCT TGT TCT GTC CAG -3'	62		
00006_pRS-LF_for	5'- GGC CCC CCC TCG AGG TCG ACG GTA TCG ATC CAT ACT CAC CCT AGA CCG G -3'	64	1055	Konstruktion des FGSG_00006 KO-Vektors, linke Flanke
00006_LF-NAT_rev	5'- TGA GCA TGC CCT GCC CCT GAG CGG CCC GGG AAG ATG TAT TGA AGC AG -3'	62		
00006_NAT-RF_for	5'- GAA TCG GGA ATG CGG CTC TAG AGT AGC GTA TTC CCT ACA TTT ACT CAG -3'	62	559	Konstruktion des FGSG_00006 KO-Vektors, rechte Flanke
00006_RF-pRS_rev	5'- GCT CTA GAA CTA GTG GAT CCC CCG GGC TGC TTA TGA CTA GTT TAC TCG CTT G -3'	64		
02685_pRS-LF_for	5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AGC GCG CGT CGA TCT CTA GAT CTT TGT TCT G -3'	62	1038	Konstruktion des FGSG_02685 KO-Vektors, linke Flanke
02685_LF-NAT_rev	5'- GAA TCG GGA ATG CGG CTC TAG AGT AGA GTT AGG TAG GGA GAT AGG AG -3'	62		
02685_NAT-RF_for	5'- TGA GCA TGC CCT GCC CCT GAG CGG CCG TAT TGA CCC TTT GTG TTG CTC -3'	64	560	Konstruktion des FGSG_02685 KO-Vektors, rechte Flanke
02685_RF-pRS_rev	5'- CTC TAG AAC TAG TGG ATC CCC CGG GCT GCC TAT TGT CAC GTT TGC CAT AC -3'	64		
07026_pRS-LF_for	5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AGC GCG CGT GGT GGA ACT GTC GTG CTC G -3'	62	1063	Konstruktion des FGSG_07026 KO-Vektors, linke Flanke
07026_LF-NAT_rev	5'- TGA GCA TGC CCT GCC CCT GAG CGG CCA GTG ATT GTG AGT TGG CTT GG -3'	62		
07026_NAT-RF_for	5'- GAA TCG GGA ATG CGG CTC TAG AGT AGG ATT GAG AAT CGG GTG GAC C -3'	62	1060	Konstruktion des FGSG_07026 KO-Vektors, rechte Flanke
07026_RF-pRS_rev	5'- CTC TAG AAC TAG TGG ATC CCC CGG GCT GCG GAG CTG CTC TTG GTA TTG -3'	62		
11047_pRS-LF_for	5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AGC GCG CGT CCT GAC GCT ATT TTA TAG CAG C -3'	64	548	Konstruktion des FGSG_11047 KO-Vektors, linke Flanke
11047_LF-NAT_rev	5'- GAA TCG GGA ATG CGG CTC TAG AGT AGG TGG GAG GAT GCC TGC AAA G -3'	64		
11047_NAT-RF_for	5'- TGA GCA TGC CCT GCC CCT GAG CGG CCG TAA GTC AAC AAG CGA TGT GG -3'	62	812	Konstruktion des FGSG_11047 KO-Vektors, rechte Flanke
11047_RF-pRS_rev	5'- CTC TAG AAC TAG TGG ATC CCC CGG GCT GAG CAG AAC AAT TGG CTA ATG TC -3'	62		
12514_pRS-LF_for	5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AGC GCG CGT GTC GGT CAA CGG CGT CGT G -3'	64	703	Konstruktion des FGSG_12514 KO-Vektors, linke Flanke
12514_LF-NAT_rev	5'- GAA TCG GGA ATG CGG CTC TAG AGT AGC GAG ATG ATC TCT TGC AGC C -3'	62		
12514_NAT-RF_for	5'- TGA GCA TGC CCT GCC CCT GAG CGG CCC TAG ATA CAA TTG GAC CGG CC -3'	64	1071	Konstruktion des FGSG_12514 KO-Vektors, rechte Flanke
12514_RF-pRS_rev	5'- CTC TAG AAC TAG TGG ATC CCC CGG GCT GTG AGT TGA GTC TTC AAC AAC CC -3'	64		

Tab. 2: Oligonukleotide zur Charakterisierung der Deletionsmutanten.

Bezeichnung	Sequenz			T _A [°C]	Produkt [bp]	Anwendung
Diagnose der Deletionsmutanten						
Gpmk1_int_for	5'-	GCC AAA AGG TCG CCA TCA AG	-3'	62	931	Internes Diagnosefragment FGSG_06385 (Gpmk1)
Gpmk1_int_rev	5'-	GTC GTG GTA AGG CTC AAG GTA	-3'	64		
Gpmk1_KOK_for	5'-	GAC AGC ACG GCC CGA G	-3'	62	2538	KO-Konstrukt FGSG_06385 (Gpmk1); Diagnosefragment
Gpmk1_KOK_rev	5'-	GCA CTA GCT TGT TCT GTC CAG	-3'	62		
00006_int_for	5'-	GTC GAC GCC ACT CAT GTT ATC	-3'	64	403	Internes Diagnosefragment FGSG_00006
00006_int_rev	5'-	CTT TGC ACC TTG GAA GAA GTC	-3'	62		
02685_int_for	5'-	TTC CAT CGT TGG GAT CCT TG	-3'	60	336	Internes Diagnosefragment FGSG_02685
02685_int_rev	5'-	TAC TGA CCA GCT CGG TAT AG	-3'	60		
07026_int_for	5'-	CAA GAT GAA GTT CCA ACT CTT C	-3'	62	287	Internes Diagnosefragment FGSG_07026
07026_int_rev	5'-	AGT ACC CGG GCG AAG AGT C	-3'	62		
11047_int_for	5'-	GGG TTA GCA ACA TTC TGC TG	-3'	60	347	Internes Diagnosefragment FGSG_11047
11047_int_rev	5'-	CTC AAT CTC ATC ATT CAT CAT G	-3'	60		
12514_int_for	5'-	GTC TCG TGA TGG ATA AGC ATC	-3'	62	353	Internes Diagnosefragment FGSG_12514
12514_int_rev	5'-	ACA ACA ACA ACG GGA ACG CG	-3'	62		
GScreen_for	5'-	GTT GTA TCT GTG ACC CTT GTT GAG	-3'	70	772	Kontrolle von cDNA; Positivkontrolle bei Diagnose-PCR
GScreen_rev	5'-	GAT GTC GTT GCC TTC CTC CT	-3'	62		
00006_SonLF_for	5'-	CCA CAT CAT TCA CAG TTC GC	-3'	60	304	Southern-Blot-Sonde, KO FGSG_00006
00006_SonLF_rev	5'-	CTT TCA TAT TCA GCC GCA AGG	-3'	62		
Gpmk1_SonLF_for	5'-	GAC AGC ACG GCC CGA G	-3'	62	550	Southern-Blot-Sonde, KO FGSG_06385 (Gpmk1)
Gpmk1_SonLF_rev	5'-	GGG TGA GGA GAA GGT G	-3'	62		

Tab. 3: Oligonukleotide zur Erstellung der Überexpressionsvektoren.

Bezeichnung	Sequenz			T _A [°C]	Produkt [bp]	Anwendung
Erstellung der Überexpressionsvektoren						
00006_BamHI_for	5'-	GGG ATC CAA AAT GTT CAG CAC GTT GTT C	-3'	62	1226	Konstruktion des FGSG_00006 OE-Vektors, FGSG_00006 mit Bam HI und NotI Schnittstellen
00006_NotI_rev	5'-	GTT TCG TAA CCG CCA TAT CTA GGC GGC CGC CA	-3'	62		
03538_ApaI_for	5'-	GGG CCC AAA ATG GAT TTC CCA AAG CCT AGA CAA G	-3'	62	1370	Konstruktion des FGSG_03538 OE-Vektors, FGSG_03538 mit ApaI und NotI Schnittstellen
03538_NotI_rev	5'-	GCG GCC GCC TAC CAA AGT AGC ACT GGA AGC C	-3'	60		
03597_ApaI_for	5'-	GGG CCC AAA ATG TCG AAA GGA ACA GTA ACA C	-3'	62	1559	Konstruktion des FGSG_03597 OE-Vektors, FGSG_03597 mit ApaI und NotI Schnittstellen
03597_NotI_rev	5'-	GCG GCC GCT TAT CGG ACA CCA GCC TGC	-3'	62		
16251_ApaI_for	5'-	GGG CCC TTT TGA CTA CCC TCG AAA TTT ACA TG	-3'	60	775	Konstruktion des FGSG_16251 OE-Vektors, FGSG_16251 mit ApaI und NotI Schnittstellen
16251_NotI_rev	5'-	GCG GCC GCA TTT ATG GAG ATA TTG TTA TTG ATT TTC GCA AAT G	-3'	62		
16620_ApaI_for	5'-	GGG CCC AAA ATG GCC ACT CTG TCG CAT C	-3'	60	2470	Konstruktion des FGSG_16620 OE-Vektors, FGSG_16620 mit ApaI und NotI Schnittstellen
16620_NotI_rev	5'-	GCG GCC GCT CAC TTT CGG TTG GAC CTG C	-3'	64		
pAN_MCS_for	5'-	GCA GAC ATC ACC GAA TAC GAC	-3'	64	variable	Sequenzierung der OE-Vektoren, bidirektional an MCS des pAN7.1_GluA
pAN_MCS_rev	5'-	GTT AAG TGG ATC ATT AAC CCT C	-3'	62	variable	

Tab. 4: Oligonukleotide zur Charakterisierung der Überexpressionsmutanten.

Bezeichnung	Sequenz			T _A [°C]	Produkt [bp]	Anwendung
Diagnose der Überexpressionssmutanten						
GScreen_for	5'-	GTT GTA TCT GTG ACC CTT GTT GAG	-3'	70	772	Kontrolle von cDNA; Positivkontrolle bei Diagnose-PCR
GScreen_rev	5'-	GAT GTC GTT GCC TTC CTC CT	-3'	62		
00006_qPCR_for	5'-	CTA GAT AAA TTC GCT GGA GTA G	-3'	62	193	qRT-PCR, FGSG_00006
00006_qPCR_rev	5'-	CGC CAA TGA TAT TAT GAA CCA C	-3'	62		
03538_qPCR_for	5'-	GGG CTC GAC AAG ACA TTT GG	-3'	62	166	qRT-PCR, FGSG_03538
03538_qPCR_rev	5'-	GAC CAT CCC TCA ACC AAG AC	-3'	62		
03597_qPCR_for	5'-	AAC AGT AAC ACA ATC GTC GTC AC	-3'	66	159	qRT-PCR, FGSG_03597
03597_qPCR_rev	5'-	TGT GTT CCA TCT TGA TAA AGC GG	-3'	66		
16251_qPCR_for	5'-	TAC TCA GAA TGC CCT CAG TCA G	-3'	66	172	qRT-PCR, FGSG_16251
16251_qPCR_rev	5'-	ATG TTA TCC ACC CTG CTA AAG AC	-3'	66		
16620_qPCR_for	5'-	AAC CTG GCT ACA CGA ATG AC	-3'	60	166	qRT-PCR, FGSG_16620
16620_qPCR_rev	5'-	AAT TGC TGC TCG TAC TTG GG	-3'	60		
Ubi_for	5'-	CTT CAC TAC ACG CAT CTA CC	-3'	60	111	qRT-PCR, Ubiquitin-Referenz
Ubi_rev	5'-	GAC AGA AGA ACT TTA GAG ATG G	-3'	62		
Tub_for	5'-	TGT CGA CGA CCA GTT CTC AGC	-3'	66	152	qRT-PCR, β-Tubulin für DON-Normalisierung
Tub_rev	5'-	CGA TGT CGG CGT CTT GGT AT	-3'	62		

Tab. 5: Oligonukleotide zur Erstellung des Transkriptionsprofils der Gene des Sekundärmetabolit-Clusters der Deoxynivalenol-Synthese.

Bezeichnung	Sequenz			T _A [°C]	Produkt [bp]	Anwendung
Transkriptionsprofil des TRI-Sekundärmetabolit-Clusters						
03529_qPCR_for	5'-	GAA GAA GGA TTT CCA GGC CA	-3'	60	174	qRT-PCR, FGSG_03529
03529_qPCR_rev	5'-	CTT ATC ACG GCC AAA GTG AG	-3'	60		
03530_qPCR_for	5'-	GGA ACA ATA CTC GGA CAA CCT	-3'	62	182	qRT-PCR, FGSG_03530
03530_qPCR_rev	5'-	TCC AGA TAT TTG ACT CCA GCC	-3'	62		
03531_qPCR_for	5'-	CGA TAT GCA AAT TGA CGC CT	-3'	58	179	qRT-PCR, FGSG_03531
03531_qPCR_rev	5'-	GCA TGG TGG AGG AAG AAG AG	-3'	62		
03532_qPCR_for	5'-	GAT GCC AGC CCT AGT AAC AC	-3'	62	189	qRT-PCR, FGSG_03532
03532_qPCR_rev	5'-	CCA GAC CAA GCG ATA GAA CAG	-3'	64		
03533_qPCR_for3	5'-	TCA CAA CCA TCA GTA GTT CCA	-3'	60	206	qRT-PCR, FGSG_03533
03533_qPCR_rev3	5'-	TCG TGT CTT CAA TAA CAA TGC C	-3'	62		
03534_qPCR_for	5'-	GCC AAG AGA TCA AGA ACC TG	-3'	60	189	qRT-PCR, FGSG_03534
03534_qPCR_rev	5'-	GCA CTG AGT TTG TAA ATA GCA C	-3'	62		
03535_qPCR_for	5'-	TTT GGT CCC ATT TCT CGC TC	-3'	60	185	qRT-PCR, FGSG_03535
03535_qPCR_rev	5'-	GAT ACC CTT CTG TTG TGC CT	-3'	60		
03537_qPCR_for	5'-	CTG CTC ATT GAA CCT TAT CCG T	-3'	64	179	qRT-PCR, FGSG_03537
03537_qPCR_rev	5'-	TTC CGC TCA TCA AAC AGG TC	-3'	60		
03538_qPCR_for	5'-	GGG CTC GAC AAG ACA TTT GG	-3'	62	166	qRT-PCR, FGSG_03538
03538_qPCR_rev	5'-	GAC CAT CCC TCA ACC AAG AC	-3'	62		
03539_qPCR_for	5'-	CAG CCG CTA AAC TGA TCG AC	-3'	62	102	qRT-PCR, FGSG_03539
03539_qPCR_rev	5'-	CAT ATG GTA GCG CAT AAA GCA G	-3'	64		
03540_qPCR_for	5'-	TTG ACA CGG AAA CAG ACA GAC	-3'	62	172	qRT-PCR, FGSG_03540
03540_qPCR_rev	5'-	GGA GCA TAG GAA GTA GAC GG	-3'	62		
03541_qPCR_for	5'-	GAG ATA ACA AGA ACG CAG CCA	-3'	62	196	qRT-PCR, FGSG_03541
03541_qPCR_rev	5'-	TTG CTG TAG AGG GAT ATG AAG G	-3'	64		
03542_qPCR_for	5'-	TGA TAC AAG GAG AGG TAA GCA C	-3'	64	186	qRT-PCR, FGSG_03542
03542_qPCR_rev	5'-	GCA AGA AAC AGG ACA TCC GT	-3'	60		
03543_qPCR_for	5'-	CTA AAG GCA ACA TCA ACT ATG AC	-3'	64	181	qRT-PCR, FGSG_03543
03543_qPCR_rev	5'-	GAA TCA CCA GCG TGA CTG AG	-3'	62		
16251_qPCR_for	5'-	TAC TCA GAA TGC CCT CAG TCA G	-3'	66	172	qRT-PCR, FGSG_16251
16251_qPCR_rev	5'-	ATG TTA TCC ACC CTG CTA AAG AC	-3'	66		

2.1.3 Vektoren

In dieser Arbeit wurden die beiden Vektoren „pJET1.2/blunt“ (Thermo Fisher Scientific, USA) und „pAN7.1_GluA“ (Punt et al., 1990; modifiziert) zur Konstruktion der Vektoren für die Überexpression der *F. graminearum* Gene FGSG_00006, FGSG_03538, FGSG_03597, FGSG_16251 und FGSG_16620 verwendet.

Im Rahmen der Vektor-Erstellung zur Deletion der *F. graminearum* Gene FGSG_00006, FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514 wurde der Vektor „pNR1“ (Malonek et al., 2004) zur Isolation der Nourseothricin-Resistenzkassette und der Vektor „pRS426“ (Christianson et al., 1992) als Shuttle-Vektor während der Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* benutzt.

2.1.4 Organismen

2.1.4.1 Pilze

Für die Erstellung und Charakterisierung der verschiedenen Mutanten in dieser Arbeit wurde der Wildtypstamm 8/1 von *F. graminearum* (Landessaatzuchtanstalt, Universität Hohenheim) verwendet.

Zur Konstruktion der Knockout-Vektoren wurde der uracil-auxotrophe Stamm FGSC 9721 (FY 834) von *S. cerevisiae* genutzt.

2.1.4.2 Bakterien

Für die Transformation von *E. coli* während des Klonierungsprozesses wurde der Stamm DH5α eingesetzt.

2.1.4.3 Pflanzen

Zur Untersuchung der Infektion von Weizen durch *F. graminearum* wurden die *Triticum aestivum* L. Kultivare 'Nandu' und 'Amaretto' verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion-Methoden

2.2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen mittels PCR wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Für die Erstellung der Klonierungsfragmente der in dieser Arbeit erstellten Vektoren wurde eine „Q5® High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England BioLabs, Deutschland) verwendet. Die PCR zur Analyse der Transformanten von *F. graminearum* und *E. coli*, zur Kontrolle erstellter cDNA sowie die PCR zur Synthese der benutzten Digoxigenin-markierten Southern-Blot-Sonden wurden mit einer „Phire Hot Start II DNA Polymerase“ (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Zur Markierung der Southern-Blot-Sonden wurde dem Reaktionsansatz Digoxigenin-11-dUTP (Roche Molecular Systems, Schweiz) zugegeben. Die Produkte der PCR wurden bei 4°C aufbewahrt. Es wurden die folgenden Reaktionen angesetzt:

	Synthese der Klonierungsfragmente	Transformanten-Analyse	Synthese der Southern-Blot-Sonde
Polymerase inkl. Puffer	12,5 µl „Q5 High-Fidelity 2X Master Mix“	5 µl „2X Phire Plant Direct PCR Master Mix“	10 µl „2X Phire Plant Direct PCR Master Mix“
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl	0,5 µl	1 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl	0,5 µl	1 µl
Template	0,5 µg DNA	0,75 µl Suspension bzw. 0,5 µg cDNA	0,5 µg DNA
Digoxigenin-11-dUTP H ₂ O	- ad 25 µl	- ad 10 µl	1,5 µl ad 20 µl

Die PCR mit jeweils 30 Zyklen wurden wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Die für das jeweilige Oligonukleotid-Paar verwendete Temperatur zur Anlagerung ist der Tabelle unter 2.1.3 zu entnehmen:

	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase		Phire Hot Start II DNA Polymerase	
Initiale Denaturierung	98°C	5 min	98°C	5 min
Denaturierung	98°C	10 s	98°C	5 s
Primer-Anlagerung	T _A (60-64°C)	30 s	T _A (60-64°C)	5 s
Elongation	72°C	30 s/kb	72°C	20 s/kb
Finale Elongation	72°C	2 min	72°C	1 min

2.2.1.2 Synthese von cDNA aus RNA

Nach der Isolation von RNA (2.2.15) wurde die Synthese der cDNA aus dieser mit dem „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Erstellung der cDNA wurde 1 µl eines 1:1 Gemisches aus den bereitgestellten oligo (dT)₁₈ Primer und zufälligen Hexamer-Primer benutzt.

Im Anschluss wurde die synthetisierte cDNA auf restliche gDNA im Ansatz, welche durch die Behandlung der RNA mit DNase I nicht eliminiert werden konnte, untersucht. Hierfür wurde eine PCR (2.2.1.1) mit den Primern „GScreen_for“ und „GScreen_rev“ auf eine Intron-beinhaltende Sequenz des Gens FGSG_00845 durchgeführt. Im Fall einer Kontamination der cDNA mit gDNA wurden in dieser Reaktion zwei Amplikons synthetisiert, eines mit einer Größe von 772 bp (Fragment aus gDNA mit Intron) und eines mit einer Länge von 495 bp (Fragment aus cDNA ohne Intron). Eine reine cDNA zeigte hingegen nur das eine Amplifikat mit der Größe von 495 bp.

Zur kurzzeitigen Lagerung wurde die cDNA bei -20°C und über einen längeren Zeitraum bei -70°C aufbewahrt.

2.2.1.3 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die Erstellung von Transkriptionsprofilen verschiedener Gene von *F. graminearum* und die Normalisierung der Deoxynivalenol-Quantifizierung (2.2.20) wurden mittels qRT-PCR vorgenommen. Für die Quantifizierung der Amplifikation wurde der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser wurde im Kit „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“ (Roche Molecular Systems, Schweiz) bereitgestellt. Die für die qRT-PCR benutzten Oligonukleotide (2.1.2, Tab. 4, Tab. 5) ermöglichten eine Amplifikation von Sequenzen mit einer durchschnittlichen Größe von 175 bp.

Als Template wurde für die Anfertigung von Transkriptionsprofilen synthetisierte cDNA (2.2.1.2) verwendet, zur Normalisierung der Deoxynivalenol-Quantifizierung wurde aus infiziertem Pflanzenmaterial isolierte gDNA (2.2.14.1) benutzt. Für jede durchgeführte qRT-PCR wurde ein Reaktions-Mastermix wie folgt vorbereitet:

5 µl	LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x)
0,5 µl	5'-3'-Primer (forward, 10 µM)
0,5 µl	3'-5'-Primer (reverse, 10 µM)
2 µl	H ₂ O (PCR Grade)
2 µl	Template (cDNA: 1:10, gDNA: 100 ng)

Jede Reaktion wurde in drei technischen Replikaten durchgeführt. In jedem Durchlauf (72 Reaktionen) wurde zu jeder untersuchten Probe eine Referenz zur relativen Berechnung der Transkriptionsstärke angefertigt. Diese war eine Reaktion zur Amplifikation einer Sequenz des codierenden Gens des sogenannten Housekeeper-Proteins Ubiquitin (FGSG_10805, Primer: „Ubi_for“ und „Ubi_rev“). Dieses Gen wurde in allen untersuchten Proben unabhängig von den Wachstumsbedingungen und durchgeführten Mutationen im Genom transkribiert und zeigt somit einen stabilen Anteil in der cDNA.

Die Reaktion erfolge in einem Rotor-Gene Q Modell „5-Plex“ (Qiagen, Deutschland) unter den folgenden Bedingungen:

Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} ×45
Primer-Anlagerung	58°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Plateauphase	52°C	90 s	
Aufschmelzen	60-95°C	5 s / 1°C	

Die Ermittlung des Ct-Werts der Reaktionen (engl. cycle threshold) und die Analyse der Schmelzkurven wurde mit der Rotor-Gene Q Software (Version 2.1.0, Build 9) durchgeführt. Zur Berechnung der relativen Expressionsdifferenz zwischen zwei Proben wurde die Software REST 2009 (engl. Relative Expression Software Tool; Pfaffl et al., 2002) verwendet.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x), pH 8,3	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Agarose-Gelelektrophoresen wurden 1,2 % Agarose-Gele (1,2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer) verwendet. Nach Polymerisierung des Gels wurde es mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die Probenkämme zur Formung der Probentaschen entfernt.

Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Auftragen in einem Verhältnis von 1:5 mit 6X DNA Loading Dye Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific, USA) versetzt. Als Molekulargewichtstandard wurde der „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Je nach gewünschter Dauer der Auftrennung wurde eine Spannung von 75 bis 125 Volt an die Gele angelegt. Zur Dokumentation wurden die Nukleinsäuren in dem Agarose-Gel für 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und so unter UV-Licht (254 nm) sichtbar. Die Gele wurden mit dem Gene Genius Bio Image System (Syngene/Synoptics, UK) fotografiert. Klonierungsfragmente und linearisierte Vektoren wurden nach der Dokumentation mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und anschließend über Silica-Säulen von der Agarose getrennt (2.2.3).

2.2.3 Nukleinsäuren-Aufreinigung mittels Silica-Säulen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten (2.2.1.1) sowie über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennter Klonierungsfragmente und linearisierter Vektoren (2.2.2) wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die gereinigten Proben wurden bei 4°C gelagert.

2.2.4 Ligation von DNA in Vektoren

Zur Ligation von PCR-Produkten (2.2.1.1) in die Vektoren „pJET1.2/blunt“ und „pAN7.1_GluA“ im Rahmen der Konstruktion der Überexpressionsvektoren wurde die T4 DNA Ligase (New England BioLabs, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Inkubation des Reaktionsansatzes wurde stets bei 16°C über Nacht durchgeführt.

Der linearisierte Vektor „pAN7.1_GluA“ wurde vor dem Einsatz in der Ligation mit der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (rSAP) (New England BioLabs, Deutschland) nach Angaben des Herstellers am 5'-Ende der DNA dephosphoryliert.

2.2.5 Transformation von *Escherichia coli*

Lysogeny Broth (LB)-Medium	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	10 g	NaCl
	ad 1000 ml	H ₂ O
LB-Agar	LB-Medium mit 16 g/l Agar	
LB_{amp}-Medium	LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin	
SOC-Medium	5 g	Hefeextrakt
	20 g	Trypton
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	2 g	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
	2,5 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	3,6 g	D-Glucose
	ad 1000 ml	H ₂ O

Für eine Amplifikation der durch eine Ligation (2.2.4) zusammengeführten Vektoren wurden diese in *E. coli* transformiert. Hierfür wurden kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms DH5 α (DNA Cloning Service, Deutschland) verwendet. Die bei -70°C gelagerten *E. coli* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 μ l der Vektor-DNA (1 ng) (2.2.4) zu der Zellsuspension gegeben und die Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C wurde die Vektor-DNA von den Zellen aufgenommen. Die Probe wurde direkt im Anschluss für 3 Minuten auf Eis gekühlt und 1 ml SOC-Medium wurde hinzugegeben. Danach wurde die Zellsuspension zur Regeneration für 40 Minuten bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Die Zellen wurden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 25 μ l auf LB_{amp}-Festmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Amplifikation der Vektoren wurden für eine Midi-Präparation (2.2.6) 100 ml LB_{amp}-Flüssigmedium mit einer Kolonie der erschienenen Transformanten inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli*

Zur Isolation der Vektoren aus den transformierten *E. coli*-Zellen (2.2.5) wurde das Kit „NucleoBond® Xtra Midi“ (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Vorbereitung der Midi-Präparation wurden 100 ml LB_{amp}-Flüssigmedium (2.2.5) mit einer Kolonie der *E. coli*-Transformanten inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die isolierten Plasmide wurden kurzfristig bei 4°C gelagert und für eine längere Lagerung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung isolierter reiner Vektor-DNA (2.2.6) wurde von der Firma Eurofins Genomics Germany (Deutschland) übernommen. Hierfür wurden insgesamt 17 μ l Sequenzierungsansatz bestehend aus 15 μ l Vektor-DNA mit einer Konzentration von 50 bis 100 ng/ μ l und 2 μ l des jeweiligen Primers („pAN_MCS_for“ bzw. „pAN_MCS_rev“) zur Sequenzierung (10 μ M) (2.1.2, Tab. 3) vorbereitet und versendet.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels der Software Lasergene SeqMan Pro (Version 7.1.0) mit der theoretischen Referenzsequenz verglichen und bei Übereinstimmung und insbesondere bei Nachweis der Unversehrtheit des Startcodons des jeweiligen Gens in den Überexpressionsvektoren für die Transformation von *F. graminearum* (2.2.12) verwendet.

2.2.8 Restriktionsverdau durch Endonukleasen

Für den Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden Enzyme der Firma New England BioLabs (Deutschland) verwendet. Die DNA wurde mit einem oder zwei Enzymen in dem zusammen mit den Endonukleasen bereitgestellten CutSmart™ Puffer bei einer Temperatur, bei der die Enzyme eine möglichst hohe Aktivität aufweisen, für mindestens eine Stunde inkubiert. Generell wurde die Reaktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wurde, sofern möglich, über Hitze inaktiviert (enzymspezifische Temperatur vom Hersteller angegeben) oder durch Fällung mittels Isopropanol beendet (2.2.9). Die Produkte wurden bei 4°C gelagert.

Eine Reaktion wurde nach folgendem Ansatz (50 µl) oder einem Vielfachen davon pipettiert:

x µl	Plasmid-DNA (>2 µg) / gDNA (<2 µg)
1 µl	Restriktionsendonuklease I (10 units)
(1 µl)	Restriktionsendonuklease II (10 units), optional
5 µl	10x CutSmart™ Buffer
ad 50 µl	H ₂ O

2.2.9 Fällung von Nukleinsäuren mittels Isopropanol

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurden Isopropanol in einem 0,7-fachen Volumen und 3 M Natriumacetat (pH 5,2) in einem 0,1-fachen Volumen zu der Lösung mit der Nukleinsäure hinzugegeben. Während einer Inkubation von 30 Minuten bei einer Temperatur von -20°C fällt die Nukleinsäure in diesem Gemisch aus und wird anschließend durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei RT getrocknet und in H₂O resuspendiert.

2.2.10 DNA-Rekombination durch Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

YPG-Medium	10 g Hefeextrakt
	10 g Trypton
	10 g D-Glucose
	ad 1000 ml H ₂ O
YPG-Agar	YPG-Medium mit 17,5 g/l Agar
SD-uracil-Medium	20 g D-Glucose
	6,7 g Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
	0,77 g TaKaRa -Ura Drop-out Zusatz
	ad 1000 ml H ₂ O
SD-uracil-Agar	SD-uracil-Medium mit 17,5 g/l Agar

Im Rahmen einer Transformation von *S. cerevisiae* können DNA-Fragmente durch homologe Rekombination zusammengefügt werden. Zur Erstellung eines Knockout-Vektors werden mindestens drei DNA-Fragmente, die linke und rechte Gen-Flanke sowie eine Resistenz-Kassette als Selektionsmarker, und der linearisierte Shuttle-Vektor „pRS426“ benötigt.

Die Gen-Flanken besitzen an beiden Seiten Überhänge, die auf einer Seite homolog zu einer Sequenz der Resistenz-Kassette und auf der anderen Seite homolog zu einer Sequenz des Shuttle-Vektors sind (Abb. 5). Sie wurden über eine PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden (2.1.2, Tab. 1) amplifiziert (2.2.1.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Selektionsmarker die Nourseothricin-Resistenz-Kassette verwendet, welche aus dem Vektor „pNR1“ mit den Endonukleasen *EcoRI* und *SacII* restringiert wurde (2.2.8). Der Vektor „pRS426“ wurde ebenfalls enzymatisch mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* linearisiert (2.2.8).

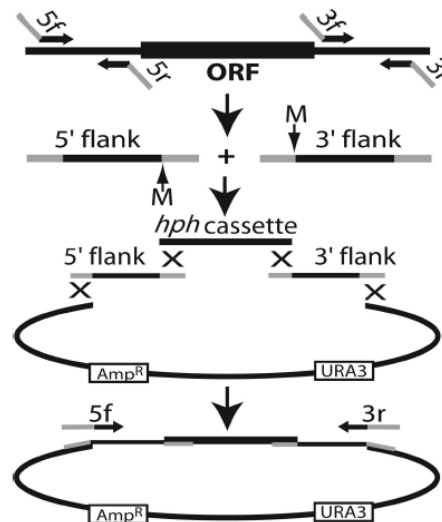


Abb. 5: Homologe Rekombination durch Transformation von *S. cerevisiae* (Colot et al., 2006). System der homologen Rekombination durch *S. cerevisiae*. Die Stellen der homologen Rekombination sind durch ein X und die Überhänge der Gen-Flanken sind grau gekennzeichnet.

Zur Vorbereitung der Transformation wurde eine Vorkultur des uracil-auxotrophen Stamms FGSC 9721 (FY 834) von *S. cerevisiae* (Winston et al., 1995) in 5 ml YPG-Flüssigmedium über Nacht bei 200 rpm und 30°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 50 ml YPG-Flüssigmedium mit 3 ml der Vorkultur inokuliert und für 4 Stunden bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zell-Pellet wurde in 1 ml 100 mM sterilem Lithiumacetat resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. In 400 µl sterilem Lithiumacetat wurde das Zell-Pellet resuspendiert.

Die Denaturierung der Träger-DNA (DNA aus Lachssperma, durchschnittliche Fragmentgröße: 7 kb) wurde für 5 Minuten bei 95°C durchgeführt und die Träger-DNA danach 5 Minuten auf Eis gekühlt.

Für die Transformation wurden nach folgendem Schema Ansätze pipettiert:

240 µl	50 % PEG 3350
36 µl	1 M LiOAc
1,5 µl	linearisierter Shuttle-Vektor „pRS426“ (100 ng)
5 µl	jedes der Fragmente des Knockout-Konstrukts (Gen-Flanken und Nourseothricin-Resistenz-Kassette; 400 bis 600 ng je Fragment)
ad 360 µl	H ₂ O

Zur Negativkontrolle (Religationskontrolle) wurden die Fragmente des Knockout-Konstrukts nicht zu dem Ansatz hinzugegeben. Für eine Positivkontrolle wurde der unverdaute zirkuläre Shuttle-Vektor pRS426 für den Transformationsansatz verwendet.

In die jeweiligen Ansätze wurden 10 µl der Träger-DNA (10 µg/ml) und 50 µl der Hefe-Zell-Suspension gegeben. Anschließend wurden die Ansätze zunächst 30 Minuten bei 30°C und dann 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 2000 rpm für 2 Minuten wurden die Zellen pelletiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 200 µl H₂O resuspendiert und 20 µl wurden 1:10 verdünnt.

Abschließend wurden die Zellsuspensionen (verdünnt und unverdünnt) auf SD-uracil-Festmedium ausplattiert und bei 30°C inkubiert, bis Transformanten erschienen.

2.2.11 Plasmid-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten *S. cerevisiae*-Kulturen (2.2.10) wurde mit Hilfe des „Invitrogen™ ChargeSwitch® Plasmid Yeast Mini Kits“ (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Die Präparation der Plasmide wurde wie durch den Hersteller angegeben durchgeführt. Zur Spheroplastierung der Hefe-Zellen wurde Lyticase aus *Arthrobacter luteus* (Merck, Deutschland) verwendet. Um die magnetischen Perlen des Kits am Grund der Reaktionsgefäße zu pelletieren, wurde abweichend zum Protokoll ein einzelner starker Magnet verwendet. Die isolierten Vektoren wurden kurzfristig bei 4°C gelagert und für eine längere Lagerung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.12 Protoplasten-Transformation von *Fusarium graminearum*

YPG-Medium	10 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	10 g	D-Glucose
	ad 1000 ml	H ₂ O
STC-CO-Puffer , pH 8,0	10 mM	Tris-HCl
	50 mM	CaCl ₂
	20 % (w/v)	Saccharose
PEG-CO-Puffer	40 % (w/v)	PEG 4000
	60 % (v/v)	STC-CO-Puffer
TB3-Puffer	20 % (w/v)	Saccharose
	0,3 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,3 % (w/v)	Säure-hydrolysiertes Casein

TB3-Agar	TB3-Puffer mit 16 g/l Agar	
H₂O-Agar	H ₂ O mit 16 g/l Agar	
Lösung A	1 g/l	Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O
Lösung B (Sterilfiltrat)	200 mg/l	KH ₂ PO ₄
	250 mg/l	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
	150 mg/l	NaCl
MNS	60 mg/l	H ₃ BO ₃
	390 mg/l	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
	13 mg/l	KI
	60 mg/l	MnSO ₄ · H ₂ O
	50,6 mg/l	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O
	5,48 g/l	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
	932 mg/l	FeCl ₃ · 6 H ₂ O
CM (Complete Medium)	2 ml/l	Chloroform
	10 ml	Lösung A
	10 ml	Lösung B
	1 ml	MNS
	10 g	D-Glucose
	2 g	Hefextrakt-Casein-Mix
	ad 1000 ml	H ₂ O
CM-Agar	CM mit 16 g/l Agar	
CM_{NAT}	CM mit 100 µg/ml Nourseothricin	
CM_{HYG}	CM mit 100 µg/ml Hygromycin B	

Zur Modifikation des Genoms von *F. graminearum* wurde eine Transformation von Protoplasten des Pilzes durchgeführt. Bei dieser wird DNA-Material wie Konstrukte zur Deletion oder Überexpression von Genen in den Zellkern von *F. graminearum* eingeschleust. Dies führt dort durch homologe oder ungerichtete Rekombination zu einer Mutation im Genom.

Im ersten Schritt der Transformation werden Protoplasten von *F. graminearum* benötigt. Hierfür wird eine Flüssigkultur durch Inokulation von 50 ml YPG-Medium mit 1×10^6 Konidien des zu transformierenden Stamms von *F. graminearum* angesetzt und über Nacht bei 28°C und unter Schütteln mit 150 rpm inkubiert. In dieser Arbeit wurden zur Transformation der Wildtyp 8/1, die Fluoreszenz-Mutante Wildtyp 8/1 DsRed (#1526.4.4) und die Deletionsmutante der Gpmk1 (FGSG_06385) ΔGpmk1 (#1597.3.1) verwendet.

Am nächsten Tag wurde das entstandene Myzel der jeweiligen Kultur durch Filtration über ein Sieb mit 40 µm Maschenweite vom Medium getrennt, mit H₂O gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet.

Zur Protoplastierung des Pilzmaterials wurde ein lytischer Enzymmix wie folgt angesetzt:

2,5 % (v/v)	Driselase® aus <i>Basidiomycetes</i> sp. (Merck, Deutschland)
0,5 % (v/v)	Lytische Enzyme aus <i>Trichoderma harzianus</i> (Merck, Deutschland)
in 10 ml	1,2 M Kaliumchlorid-Lösung

Der angesetzte Enzymmix wurde 30 Minuten gerührt und im Anschluss 10 Minuten bei 4100 rpm zentrifugiert. Das Überstand wurde über einen Filter mit einer Maschenweite von 0,22 µm sterilfiltriert. Die Protoplastierung wurde in 2,5 Stunden mit 0,5 g Pilzmyzel in 10 ml des Enzymmixes in einem 50 ml Erlenmeyerkolben bei 30°C und 80 rpm durchgeführt. Um restliches Myzel und Trümmer von den Protoplasten zu trennen, wurden diese sequenziell über ein Sieb mit einer Maschenweite von 100 µm und ein Sieb mit einer Maschenweite von 40 µm filtriert und mit 10 ml einer 1,2 M Kaliumchlorid-Lösung gewaschen. Der Durchfluss wurde bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aus Protoplasten wurde behutsam (mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze) mit 10 ml STC-CO-Puffer gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 Minuten wurde die Konzentration der Protoplasten auf 1×10^8 Zellen pro ml mit STC-CO-Puffer eingestellt. Im folgenden Schritt wurden 200 µl dieser Suspension (2×10^7 Protoplasten) in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 30 µl einer Lösung mit dem vorbereiteten DNA-Material zur Modifikation des Genoms (5-7 µg) versetzt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG-CO-Puffer vorsichtig mit dem Ansatz vermischt und erneut für 20 Minuten bei RT inkubiert. Für den Regenerationsprozess der transformierten Protoplasten wurden 5 ml TB3-Puffer zu dem Ansatz hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Im letzten Schritt wurden 45 ml TB3-Agar (~50°C) zu den Protoplasten gegeben und anschließend auf fünf Petrischalen (Ø 92 mm) verteilt. Zur vollständigen Regeneration der Protoplasten wurden diese Platten über Nacht bei 28°C im Dunklen inkubiert.

Um eine Selektion der entstandenen Transformanten zu ermöglichen, wurden die Platten nach erfolgreicher Regeneration mit jeweils 10 ml eines H₂O-Agars mit dem zugehörigen Selektions-Antibiotikum (Nourseothricin: 100 µg/ml, Hygromycin B: 100 µg/ml) überschichtet und erneut bis zum Durchbruch transformierter Pilzkolonien durch diese Selektionsschicht bei 28°C in Dunkelheit inkubiert.

- Selektion von *Fusarium graminearum* Transformanten und Vereinzelung von Konidien

Zur weiteren Kultivierung der Transformanten wurde der Selektionsagar unterhalb des Myzels durchgewachsener Kolonien mittig abgetragen und auf CM-Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikums-Zusatz (CM_{NAT} bzw. CM_{HYG}) übergesetzt. Eine folgende Inkubation der Kolonien erfolgte bei 28°C ohne Licht.

Da die Protoplasten von *F. graminearum* mehrere Zellkerne enthalten, kann in der Regel nicht davon ausgegangen werden, dass alle Kerne erfolgreich transformiert wurden. Die Zellkerne einer Konidie sind hingegen homokaryotisch. Aus diesem Grund wurde eine

Vereinzelung von Konidien der erfolgreich kultivierten Transformanten durchgeführt. Hierfür wurden die Petrischalen der selektierten Myzelkolonien mit 500 µl sterilem H₂O mehrfach gespült. Dadurch werden geringe Mengen an von den Kolonien gebildeten Konidien aufgenommen, anschließend auf H₂O-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 28°C inkubiert. Mit Hilfe eines Binokulars wurden ausgekeimte Konidien erfasst, ausgeschnitten und auf CM_{NAT}- oder CM_{HYG}-Festmedium umgesetzt. Die vereinzelter Konidien wurden bei 28°C inkubiert, bis diese ausreichend Myzel für die Charakterisierung der Transformanten und weitere Analysen gebildet hatten.

2.2.13 Kultivierung von *Fusarium graminearum*

- **Anzucht auf Festmedium**

F. graminearum wurde auf CM-Festmedium (2.2.12) bei 28°C im Dunkeln kultiviert. Hierfür wurden Petrischalen mit CM-Agar durch Umsetzen eines Myzel-Agar-Blocks einer Pilzkolonie inokuliert oder es wurde eine punktuelle Inokulation der Plattenmitte mit 5000 Konidien von *F. graminearum* vorgenommen. Zur Selektion wurde dem CM-Festmedium ein Antibiotikum zugesetzt (Nourseothricin: 100 µg/ml, Hygromycin B: 100 µg/ml).

- **Anzucht in Flüssigmedium**

Für eine Myzelkultur in CM-Flüssigmedium (2.2.12) wurde eine Inokulation des Mediums mit neun Myzel-Agar-Blöcken mit einer Kantenlänge von 3 mm von einer CM-Agarplatten oder mit 5000 Konidien durchgeführt. Die Kultur wurde bei 200 rpm und 28°C ohne Licht inkubiert. Für die Isolation von gDNA mittels CTAB-Lysepuffer (2.2.14.1) und die Isolation von RNA (2.2.15) wurde die Inkubation über drei Tage durchgeführt. Das Myzel wurde hierfür über einen Filter mit einer Maschenweite von 100 µm geerntet, zwei Mal mit H₂O gewaschen und anschließend lyophilisiert.

- **Anzucht von Konidien**

Weizen-Medium

15 g Weizenblätter (frisch, zerkleinert)
ad 1000 ml H₂O

Zur Induktion der Konidienbildung wurden 5 ml Weizen-Flüssigmedium mit zehn Myzel-Agar-Blöcken mit einer Katenlänge von 1 mm von einer CM-Agarplatten inokuliert. Diese wurden bei 200 rpm und 28°C für sechs Tage in Dunkelheit inkubiert. Die Konidienkonzentration im Medium wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt und nach Entfernen des Mediums mit sterilem H₂O auf eine gewünschte Konzentration eingestellt.

2.2.14 Isolation genomischer DNA aus *Fusarium graminearum* und Weizen

2.2.14.1 DNA-Isolation mit CTAB-Lysepuffer

CTAB-Lysepuffer, pH 8,0

2 % (w/v)	CTAB
100 mM	Tris-HCl
20 mM	EDTA
1,4 M	NaCl

Zur Isolation genomischer DNA (gDNA) aus Myzel-Flüssigkulturen von *F. graminearum* (2.2.13) sowie infizierten Weizenähren (2.2.17.1) wurde ein CTAB-Lysepuffer verwendet. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt und mechanisch durch Mörsern zerkleinert. Etwa 10 bis 30 mg des so entstandenen Pulvers einer Myzelkultur bzw. 50 mg des Pulvers einer infizierten Weizenähre wurden in 900 µl CTAB-Lysepuffer aufgenommen und für 60 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 900 µl Chloroform gegeben und nach zehnmalem Invertieren der Probe wurde diese bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere der so gebildeten Phasen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der isolierten DNA mit 750 µl Isopropanol versetzt. Die Lösung wurde durch vorsichtiges Invertieren durchgemischt und bei 13000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol bei 13000 rpm für 5 Minuten gewaschen. Das Ethanol wurde anschließend vollständig entfernt und das DNA-Pellet möglichst kurz bei RT luftgetrocknet. Das DNA-Pellet wurde bei einer Isolation aus Myzelkulturen in 450 µl H₂O, welchem 4 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben wurde, und bei einer Isolation aus Weizenmaterial in 100 µl H₂O resuspendiert und bei 55°C bis zur vollständigen Lösung des Pellets schüttelnd inkubiert. Die isolierte genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.2.14.2 Präparation von Myzel zur Direkt-PCR

Für die initiale Analyse der erstellten Transformanten (2.2.12) mittels PCR (2.2.1.1) wurde Luftmyzel einer Kultur von Festmedium mit einer 200 µl-Pipettenspitze aufgenommen und in 30 µl Dilution Buffer des Kits „Phire Plant Direct PCR Master Mix“ (Thermo Fisher Scientific, USA) in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde das Myzel kurz mit der Pipettenspitze in dem Reaktionsgefäß „gemörsert“. Von dieser Zellsuspension wurden 0,75 µl für die PCR (2.2.1.1) verwendet.

2.2.15 RNA-Isolation aus *Fusarium graminearum* und Weizen

Zur Synthese von cDNA (2.2.1.2) wurde RNA aus Myzel-Flüssigkulturen von *F. graminearum* (2.2.13) und infizierten Weizenähren (2.2.17) isoliert. Hierfür wurde das Reagenz peqGOLD TriFast™ (Avantor, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Probenmaterial wurde zur Isolation unter flüssigem Stickstoff in einem Mörtel zu Pulver zerkleinert. Die isolierte RNA wurde in 30 µl H₂O aufgenommen und bei -70°C gelagert. Die Integrität der isolierten RNA wurde vor der weiteren Verwendung mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2) überprüft.

2.2.16 Southern-Blot-Analyse

SSC-Puffer (20x)	3 M 300 mM	NaCl Natriumcitrat
B1-Puffer (5x)	500 mM	Maleinsäure
Blockierungsreagenz (10 %)	10 % (w/v)	Blocking Reagent (Roch, Schweiz) in B1-Puffer
Prähybridisierungspuffer	0,1 % (w/v) 0,2 % (w/v) 2 %	N-Laurylsarcosin SDS Blockierungsreagenz in SSC-Puffer (5x)
Hybridisierungspuffer	20 ml 20 µl	Prähybridisierungspuffer Digoxigenin-markierte Sonde
Waschlösung 1	0,1 % (w/v)	SDS in SSC-Puffer (2x)
Waschlösung 2	0,1 % (w/v)	SDS in SSC-Puffer (0,2x)
Waschpuffer	0,3 % (v/v)	Tween 20 in B1-Puffer (1x)
B2-Puffer	1 % (v/v)	Blockierungsreagenz in B1-Puffer (1x)
Antikörperlösung	1:10000	Anti-Digoxigenin-AP Fab-Fragmente (Roche, Schweiz) in B2-Puffer
B3-Puffer, pH 9,5	100 mM 100 mM	Tris-HCl NaCl
CSPD-Lösung	1:100	CSPD (Roche, Schweiz) in B3-Puffer

Um die Position und Häufigkeit der Integration von Knockout-Konstrukten in den erstellten Deletionsmutanten nach der *F. graminearum*-Transformation (2.2.12) zu bestimmen, wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde eine speziell markierte Sequenz des Knockout-Konstrukts als Sonde verwendet, welche mit der restringierten genomischen DNA der Transformanten hybridisierte.

An die Sonde konnte ein spezifischer, enzymgekoppelter Antikörper binden. In der folgenden Umsetzung eines chemilumineszenten Substrats (CSPD) wurde Licht emittiert, welches optisch mittels LAS-3000 (Fuji Photo Film, Japan) detektiert werden konnte.

2.2.16.1 Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran

Die aus den Transformanten der Deletionsmutanten isolierte gDNA (2.2.14.1) wurde mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut (2.2.8) und anschließend zur Reduktion des Reaktionsvolumens mit Isopropanol gefällt (2.2.9). Die zu analysierenden Proben wurden elektrophoretisch in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2.2.2). Dieses Gel wurde zur Vorbereitung des Transfers der DNA für 10 Minuten mit einem Depurinierungspuffer (0,25 M HCl) inkubiert. Dies führte zu einer teilweisen Depurinierung der DNA im Gel, welche den Transfer von DNA-Fragmenten über 5 kb Länge begünstigte. Durch eine Inkubation des Gels für 10 Minuten in einem Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) wurde die DNA denaturiert. Abschließend wurde das Gel für 10 Minuten in einem Neutralisationspuffer (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) inkubiert.

Durch einen Kapillar-Transfer mit einem Hochsalzpuffer (20 x SSC-Puffer) wurde die DNA über Nacht auf die Nylon-Membran (Amersham Hybond™ NX; GE Healthcare Life Science, UK) übertragen. Hierfür wurde das Gel auf einer mit 20 x SSC-Puffer-getränkten Filterpapierbrücke platziert. Die Enden der Filterpapierbrücke hingen in einem mit 20 x SSC-Puffer gefüllten Gefäß. Auf das Gel wurden die 2 x SSC-Puffer-getränkte Nylon-Membran und vier 2 x SSC-Puffer-getränkte Filterpapiere gelegt. Zur Verstärkung der Kapillarkräfte wurden ein Stapel Papiertücher und ein Gewicht (etwa 500 g) auf die Filterpapiere gesetzt.

Am nächsten Tag wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (1200 mJ/cm im Stratalinker; Stratagene, USA) kovalent an die Nylon-Membran gebunden.

2.2.16.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Zum Beginn der Prähybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre für 2 Minuten bei RT in 2 x SSC-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der 2 x SSC-Puffer entfernt und durch 20 ml Prähybridisierungslösung ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 Stunden bei 68°C in einem Hybridisierungsofen (Hybrid Mini 38; Bachhofer, Deutschland). Der Puffer in der Hybridisierungsröhre wurde durch den Hybridisierungspuffer (20 ml Prähybridisierungspuffer mit der Digoxigenin-markierte Sonde) ersetzt und über Nacht bei 68°C inkubiert. Zuvor wurde die Digoxigenin-markierte Sonde (2.2.1.1) für 10 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt.

Am nächsten Tag wurde der Hybridisierungspuffer entfernt und die Nylon-Membran zweimal für 5 Minuten mit 50 ml Waschlösung 1 bei RT gewaschen. Anschließend folgte das zweimalige Waschen der Nylon-Membran für 15 Minuten mit 50 ml auf 68°C vorgeheizter Waschlösung 2 bei 68°C.

2.2.16.3 Detektion

Zur Detektion wurde die Nylon-Membran zunächst mit etwas Waschpuffer gespült und für 60 Minuten in 15 ml Blocking-Puffer B2 inkubiert. Der Blocking-Puffer B2 wurde entfernt und durch 15 ml Antikörperlösung ersetzt. Die Dauer der Inkubation durfte 30 Minuten nicht überschreiten. Anschließend wurde die Nylon-Membran dreimal mit je 50 ml Waschpuffer für 20 Minuten gewaschen und darauffolgend für 5 Minuten in 15 ml B3-Puffer inkubiert.

Auf die DNA-Seite der Nylon-Membran wurden 500 µl CSPD-Lösung gegeben und für 5 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Die Nylon-Membran wurde in eine Kunststoffolie eingeschweißt und zur Verstärkung der Chemilumineszenz-Reaktion für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Das emittierte Licht wurde optisch über eine Langzeitbelichtungsreihe im LAS-3000 (Fuji Photo Film, Japan) detektiert.

2.2.17 Infektion von *Triticum aestivum* L. durch *Fusarium graminearum*

2.2.17.1 Infektion von Weizenähren

Für die Infektionsstudien mit verschiedenen Stämmen von *F. graminearum* auf Weichweizen (*T. aestivum* L.) wurden die Kultivare 'Nandu' und 'Amaretto' verwendet.

Die Ähren des jeweiligen Kultivars wurden zum Zeitpunkt der Anthese mit 10 µl einer Konidien-Suspension (50 Konidien/µl; 2.2.13) auf den inneren Blütenorganen zwischen Deck- und Vorspelze der Blüte eines Ährchens inokuliert. Pro Ähre wurden zwei gegenüberliegende Ährchen in der Ährenmitte inokuliert. Zum Schutz und zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit, wurden die inokulierten Ähren für die ersten drei Tage mit einer innen befeuchteten Kunststoffüte bedeckt. Drei Wochen nach der Infektion (21 dpi) wurden die Ähren geerntet und die Infektion dokumentiert. Für die Quantifizierung der Menge des eingelagerten Deoxynivalenol in einer Ähre und die Isolation von gDNA zur Normalisierung der ermittelten Konzentration wurden die inokulierten Pflanzen bereits nach 14 Tagen geerntet. Für die Anfertigung der Transkriptionsprofile der Sekundärmetabolit-Cluster-Gene der Deoxynivalenol-Biosynthese wurden infizierten Ähren nach sieben Tagen verwendet.

2.2.17.2 Infektion von präparierten Weizenblüten

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (2.2.21) der Infektion von pflanzlichem Gewebe durch verschiedene Stämme von *F. graminearum* wurden Vorspelzen (Paleae) der Ähren des Weichweizenkultivars 'Nandu' (*T. aestivum* L.) verwendet. Diese wurden mit einer Rasierklinge aus sich in der Anthese befindenden Ährchen herauspräpariert und in einer Lösung von 0,01 % (v/v) Tween 20 für 15 Minuten gewaschen. Vor der Inokulation mit 5 µl einer Konidien-Suspension (20 Konidien/µl, 2.2.13) auf der konvex gewölbten Außenseite der Vorspelzen wurden diese zweimal mit H₂O gewaschen und auf Petrischalen mit H₂O-Agar (2.2.12) platziert (15 pro Platte).

Nach der Inokulation wurden die mit Parafilm® M (Bemis Company, USA) versiegelten Petrischalen für sieben Tage in einer Wachstumskammer bei 22°C und einer Beleuchtungsphase von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit inkubiert.

2.2.18 Wachstumsstudie unter induziertem Stress

Zur Untersuchung der Reaktion der verschiedenen Stämme von *F. graminearum* auf die Induktion von Stress wurde eine Wachstumsstudie auf CM-Festmedium (2.2.12) mit verschiedenen Zusätzen durchgeführt. Hierfür wurde ein rundes Stück Agar mit Myzel des Versuchsstamms (Ø 6 mm) aus der Wachstumszone einer Vorkultur auf CM-Festmedium (2.2.13) ausgestochen und auf die Versuchsplatte mit dem stressinduzierenden Medium überführt. Nach drei Tagen bei 28°C im Dunkeln wurde das Wachstum der Kolonien dokumentiert. Es wurde stets ein Referenzansatz mit dem Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ zum gleichen Zeitpunkt angesetzt.

- **Induktion von osmotischem Stress**

Eine Reaktion auf hyperosmotische Wachstumsbedingungen wurde durch die Zugabe von 0,8 M und 1,2 M Natriumchlorid (NaCl) zum CM-Festmedium induziert.

- **Induktion von oxidativem Stress**

Die Reaktion auf oxidativen Stress wurde durch einen Zusatz von 10 mM, 15 mM und 20 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zum CM-Festmedium induziert.

2.2.19 Färbung von *Fusarium graminearum* mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

Um den Oxidationszustand verschiedener Stämme von *F. graminearum* zu untersuchen, wurde eine Färbung mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) durchgeführt.

Hierfür wurden Pilz-Kolonien auf CM-Festmedium (2.2.12, 2.2.13) drei Tage nach der Inokulation verwendet. Die Platten mit dem Myzel wurden mit 20 ml einer 0,2 % (w/v) NBT-Lösung in H_2O überdeckt und für 45 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die NBT-Lösung entfernt und die Kolonie mit reinem Ethanol gewaschen, um die Färbereaktion zu stoppen. Die Platten wurden erneut für 45 Minuten bei RT und Dunkelheit inkubiert und anschließend dokumentiert.

2.2.20 Quantifizierung von Deoxynivalenol (DON)

Die Quantifizierung von DON in infizierten Weizenähren des Kultivars 'Nandu' (2.2.17.1) wurde mit dem Kit „RIDASCREEN®FAST DON“ (r-biopharm, Deutschland) durchgeführt. Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Analyse wurden vier Ährchen einer infizierten Weizenähre sieben Tage nach der Inokulation benutzt. Bei diesen handelte es sich um die zwei inokulierten Ährchen sowie das jeweils ober- bzw. unterhalb dieser gelegenen Ährchen. Das Pflanzenmaterial wurde lyophilisiert und unter flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemörsert. Zur Isolation des DON wurden 50 mg von diesem für eine Stunde in 1 ml H₂O geschüttelt. Der Ansatz wurde bei 13000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Quantifizierung verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde für eine gDNA-Isolation mit CTAB (2.2.14.1) eingesetzt. Die isolierte gDNA wurde in einer zur Normalisierung der ermittelten Konzentrationen von DON durchgeführten qRT-PCR (2.2.1.3) verwendet.

In dieser wurde mit den Primern „Tub_for“ und „Tub_rev“ eine Sequenz des β -Tubulin codierenden Gens FGSG_06611 amplifiziert. Zur Erstellung einer Referenzkurve wurde neben gDNA der zu testenden Proben auch gDNA des Wildtyps 8/1 in fest definierten Konzentrationen (0,01 ng/ μ l, 0,1 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 10 ng/ μ l und 100 ng/ μ l) als Template der qRT-PCR eingesetzt.

2.2.21 Analysen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde das LSM 780, Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Deutschland) verwendet. Die Steuerung des Mikroskops, die Aufnahme der Z-Stapel und die Berechnung der Maximumintensitätsprojektion (MIP) wurden mit der ZEISS Efficient Navigation Software durchgeführt.

Für die Vorbereitung der Proben wurden die infizierten Paleae (2.2.17.2) mit einer Rasierklinge in kleinere, ebene Fragmente präpariert. Zur Färbung des Chitins in der Zellwand von *F. graminearum* wurden die Pflanzenpräparate mindestens 30 Minuten in einer Lösung von WGA-CF™ 488A (Biotium, USA) bei RT im Dunklen inkubiert. Die Präparate wurden anschließend in einem mit Perfluorodecalin (95 %; Merck, Deutschland) gefüllten Gene Frame® (25 μ l; Thermo Fisher Scientific, USA) auf einem Glas-Objektträger versiegelt und betrachtet.

Die Fluoreszenz des Farbstoffs WGA-CF™ 488A wurde mit Licht einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und das emittierte Licht zwischen 500 nm und 568 nm detektiert. Das Fluoreszenzprotein DsRed wurde mit einer Wellenlänge von 561 nm angeregt und das emittierte Licht zwischen 570 nm und 640 nm aufgenommen. Die Anregung der Autofluoreszenz des Pflanzenmaterials wurde mit einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt und die Emission zwischen 500 nm und 568 nm detektiert.

2.2.22 Erstellung der cDNA-Banken (Transkriptome)

2.2.22.1 Präparation der Proben

Zur Erstellung von cDNA-Banken des *F. graminearum* Wildtyp-Stamms 8/1 und der Deletionsmutante Δ Gpmk1 wurden Myzelkulturen, sowie Laufhyphen (runner hyphae, RH) und Infektionskissen (Infection cushions, IC) verwendet.

Für die Präparation der Myzelkulturen wurden 50 ml CM mit 750 Konidien des jeweiligen Stamms inokuliert und bei 160 rpm und 26°C für 3 Tage inkubiert. Ein Myzelfragment von etwa 1 mm Durchmesser wurde für die folgende RNA-Isolation und Anfertigung der cDNA-Banken verwendet.

Zur Isolation von Infektionskissen und Laufhyphen mittels Laser Capture Mikrodissektion (LCM) von der Oberfläche infizierter Vorspelzen von Weizen wurden diese mit Konidien des Wildtyps 8/1 bzw. der Δ Gpmk1 inokuliert und inkubiert (2.2.17.2). Haben sich Laufhyphen und Infektionskissen auf den Vorspelzen gebildet, wurden diesen Spelzen das obere und untere Ende entfernt und unmittelbar in 99,9 % Ethanol auf Eis überführt. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und die Pflanzenproben für 12 Stunden lyophilisiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Proben bei -80°C luftdicht gelagert. Zur Vorbereitung des Transfers der Laufhyphen und Infektionskissen wurde auf einen Objektträger (76 x 26 x 1 mm, Carl Roth, Deutschland) eine dünne klebende Schicht von 120 μ l Liquid Cover Glass (Carl Zeiss, Deutschland) aufgetragen. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgetropft und die präparierten Objektträger für 5 Minuten bei RT getrocknet. Für den Transfer des Pilzmaterials wurden pro Objektträger sechs Palea-Fragmente mit der inokulierten Seite auf den Träger platziert und mit dem Ende einer Pinzette langsam festgedrückt. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend vollständig entfernt.

Die Identifikation und Isolation der Laufhyphen bzw. Infektionskissen wurde mit dem inversen Mikroskop PALM MicroBeam (Carl Zeiss, Deutschland) durchgeführt. Beide Zelltypen wurden mit der Auto-LPC-Funktion der PALM Robo Software (Version 4.3 SP2) selektiert und unter folgenden Einstellungen isoliert: Cutting energy: 32 mit focus: 64, catapulting: delta 25 of cutting energy mit focus: -2. Die ausgewählten Pilzzellen wurden in die selbstklebenden Deckel von speziellen 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Carl Zeiss, Deutschland) katapultiert und bei -80°C gelagert. Für die Erstellung der cDNA-Banken wurde pro Probe und Replikat eine Fläche von $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ für die Laufhyphen (etwa 900 Zellen) und eine Fläche von $0,15 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ für die Infektionskissen (etwa 450 Strukturen) von der Pflanzenoberfläche gesammelt. Die Isolation von Laufhyphen und Infektionsstrukturen wurde jeweils von verschiedenen Pflanzenfragmenten an verschiedenen Tagen durchgeführt, um eine Kontamination der Proben durch den jeweils unerwünschten Zelltyp zu vermeiden.

Die folgende Bearbeitung der Proben zur Isolation der mRNA (2.2.22.2), Synthese der einzelsträngigen cDNA (ss cDNA) (2.2.22.3) und doppelsträngigen cDNA-Bank-Konstruktion (2.2.22.4, 2.2.22.5) wurde nach einem modifizierten Protokoll für Mais-Zellen von Lê et al., (2005) durchgeführt.

2.2.22.2 Isolation von mRNA

Die Isolation der mRNA des jeweiligen Zelltyps wurde mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit (Invitrogen, Dynal, Deutschland) unter folgenden Spezifikationen durchgeführt. Zur Lyse der Zellen wurden 50 µl Lysis/Binding Buffer zu den gesammelten Pilzproben (2.2.22.1) zugegeben und die Reaktionsgefäße wurden mit dem Deckel nach unten gerichtet für eine Minute bei RT mit Hilfe eines Vortex durchmischt. Nach dem Waschen von 15 µl Dynabeads® Oligo (dT)₂₅ mit 50 µl Lysis/Binding Buffer wurde das Zelllysate zu den Dynabeads® gegeben. Die Hybridisierung wurde für 10 Minuten bei RT auf einem Rollmischer durchgeführt. Der Überstand wurde entfernt und der Dynabeads®/mRNA-Komplex jeweils zweimal mit 50 µl washing buffer und anschließend 50 µl first-strand buffer gewaschen. Der Komplex wurde in 3 µl H₂O aufgenommen und für die Synthese der Erst-Strang cDNA (2.2.22.3) verwendet.

2.2.22.3 Synthese der Erst-Strang cDNA

Zur Synthese der Erst-Strang cDNA durch eine „switching mechanism at 5' end of the RNA transcript polymerase chain reaction“ (SMART-PCR) wurde das SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich) verwendet. Zu den 3 µl isolierter mRNA der jeweiligen Probe (2.2.22.2) wurde 1 µl 3' SMART CDS Primer II A (12 µM) zugegeben und für 2 Minuten bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl eines SMART-PCR-Mastermixes, der folgendermaßen angesetzt wurde, hinzugefügt:

2 µl	5x First-Strand Buffer
0,25 µl	DTT (100 mM)
1 µl	dNTP Mix (10 mM)
1 µl	SMARTer II A Oligonucleotide (12 µM)
0,25 µl	RNase Inhibitor
1 µl	SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)
0,5 µl	H ₂ O

Die PCR wurde für 90 Minuten bei 42°C durchgeführt und durch eine Inkubation für 10 Minute bei 72°C terminiert. Das Produkt wurde kurzfristig auf Eis oder über Nacht bei -20°C gelagert und für die folgende Synthese der doppelsträngigen (ds) cDNA (2.2.22.4) verwendet.

2.2.22.4 Long Distance PCR (LD-PCR)

Die Vervielfältigung der erstellten Erst-Strang cDNA (2.2.22.3) zu ds cDNA wurde mit dem Advantage® 2 PCR Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich) mittels Long distance-PCR (LD-PCR) durchgeführt. Der optimale Reaktions-Zyklus jeder Probe, in welchem sich die ds cDNA-Amplifikation kurz vor Abschluss der exponentiellen Phase der Synthese befindet, wurde anhand zweier aufeinanderfolgend durchgeführten LD-PCR ermittelt. Hierfür wurde eine erste Testreaktion mit insgesamt 32 Zyklen in einem Gesamtvolumen von 50 µl (1 µl Template-Erst-Strang-DNA (2.2.22.3) und 49 µl Reaktionsmastermix) gemacht. Der Mastermix wurde wie folgt angesetzt:

5 µl	10x Advantage 2 PCR Buffer
1 µl	dNTP Mix (10 mM)
1 µl	5' PCR Primer II A (12µM)
1 µl	50x Advantage 2 Polymerase Mix
41 µl	H ₂ O

Diese wurde jeweils in den Zyklen 15, 18, 21, 24, 27, 30 und 32 beprobt und das Amplikon wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2) analysiert. Die zweite Testreaktion mit einem angepassten 25 µl Gesamtvolumen wurde in jedem Zyklus zwischen den beiden Zyklen der ersten Testreaktion mit der stärksten Amplifikation beprobt. Nach dieser Bestimmung wurde die restliche Erst-Strang cDNA (2.2.22.3) in einer finalen LD-PCR mit einer Zyklus-Anzahl von einem Zyklus vor der Sättigung oder Stagnation der Reaktion verwendet. Die Reaktionen wurden in mehrere 50 µl Ansätze aufgeteilt, nach der Amplifikation vereinigt und anschließend aufgereinigt und finalisiert (2.2.22.5).

Die LD-PCR wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	1 min	} bis zu 32 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Primer-Anlagerung	65°C	30 s	
Elongation	68°C	6 min	

2.2.22.5 Aufreinigung und Finalisierung der doppelsträngiger cDNA-Banken

Um Reaktionsreagenzien aus den ds cDNA-Banken (2.2.22.4) zu entfernen, wurden diese mit dem Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Pro Probe wurden zur Aufreinigung zwei Silica-Membran-Säulen verwendet. Die Elution der Proben wurde zweimal mit 35 µl Elutionspuffer pro Säule durchgeführt.

Zur Finalisierung der gereinigten ds cDNA-Banken wurden diese mit dem End-It™ DNA End-Repair Kit (Epicentre®, USA) am 5'-Ende phosphoryliert und zu blunt-end cDNA aufgefüllt. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die finalisierten ds cDNA-Banken erneut wie zuvor aufgereinigt. Die Elution wurde zweimal mit 25 µl Elutionspuffer pro Säule durchgeführt. Die ds cDNA-Banken wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2) untersucht und mittels NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, USA) fluorometrisch quantifiziert.

2.2.22.6 Illumina-Sequenzierung der ds cDNA-Banken und Zuordnung der RNA-Seq-Daten zum Referenzgenom von *F. graminearum*

Die Illumina-Sequenzierung der ds cDNA Banken von jeweils drei unabhängigen Replikaten von Lauffhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Deletionsmutante Δ Gpmk1 wurden mit jeweils 1 µg der finalen ds cDNA (2.2.22.5) von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Adam Grundhoff (Heinrich-Pette-Institute, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierung der ds cDNA-Banken der Myzelkulturen des Wildtyps 8/1 und der Deletionsmutante Δ Gpmk1 wurde mit je 1 µg von jeweils drei unabhängigen Replikaten vom Beijing Genomics Institute Hong Kong (China) durchgeführt.

Die im Sequenzierungsprozess gelesenen DNA-Abschnitte (Reads) wurden mit der Software tophat2 (Version 2.0.8) dem Referenzgenom von *F. graminearum* PH-1 durch Ulrich Güldener (Technische Universität München, Deutschland) und Martin Münsterkötter (Helmholtz Zentrum München, Deutschland) zugeordnet. Das Intervall für die erlaubte Länge der Introns wurde auf mindestens 20 nt und auf maximal 1 kb festgelegt (Trapnell et al., 2009; Kim et al., 2013). Die Häufigkeit von Transkripten der Referenz-Gene wurde mit dem Tool „cufflinks“ in Fragmenten pro Kilobase von Exons auf eine Millionen zugeordneter Fragmente (engl. **F**ragments **P**er **K**ilobase of exons per **M**illion fragments mapped, FPKM) bestimmt. Die differenzielle Expression wurde mit dem Tool „cuffdiff“ berechnet (Trapnell et al., 2010, 2012). Das Gen-Modell wurde als „raw junctions“ einbezogen. Zur folgenden Analyse wurde ein Grenzwert von einer mindestens 4-fachen Zunahme oder Verringerung der Genexpression ($|\log_2 \text{ of the FPKM values } +1| \geq 2$) zwischen zwei Proben für eine differentielle Regulation festgelegt.

2.2.23 Bioinformatische Aufarbeitung der Transkriptom-Daten

Die Proteine von *F. graminearum* wurden für eine detaillierte Auswertung der Transkriptom-Daten (2.2.22) in verschiedene Kategorien eingeteilt. Funktionsübergreifend wurden sie so in nicht-sekretierte Proteine (non SP) und sekretierte Proteine (SP) unterteilt. Sekretierte Proteine wurden anhand einer Analyse mittels TargetP (RC von 1-3 mit Signalsequenz), SecretomeP (nn_score von >0,65) und WoLF PSORT (definiert als „extr“) identifiziert.

Die folgenden Funktionen wurden zur Einteilung der Gene herangezogen: Transkriptionsfaktoren (TF), Transporterproteine (TP), Histon-modifizierende Proteine (HM), Proteinkinasen/-phosphatasen (PK), Dehydrogenasen (DH), kohlenhydrataktive Enzyme (CAZy), putative Effektorproteine (PE), Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten (SMC).

Putative Effektorproteine wurden dabei als sekretierte Proteine definiert, die entweder eine Proteindomäne bereits bekannter Effektorproteine in den Datenbanken IPRO und Pfam zeigten, oder keine bekannte Domäne besitzen, keine Sekundärmetabolit-Cluster angehören und kleiner als 1000 Aminosäuren sind.

Die kohlenhydrataktiven Enzyme wurden anhand der „CAZy-Klassifizierung“ und der zugehörigen CAZy-Datenbank unterteilt (Lombard et al., 2014).

Die Einteilung der Gene die Teil eines Sekundärmetabolit-Clusters sind, wurde von Sieber et al., (2014) durchgeführt und für die Analyse der Transkriptom-Daten übernommen.

Die Heatmaps zur Darstellung der Transkriptionsmuster verschiedener Kategorien und Vergleiche in der Auswertung der Genexpression wurden mit einer angepassten Funktion „heatmap.2“ in der Programmiersprache R berechnet. Die Werte wurden in der Heatmap anhand des euklidischen Abstands zwischen den Vergleichspaaren hierarchisch gruppiert. Zur Nutzung dieser Funktion wurde die grafische Benutzeroberfläche und integrierte Entwicklungsumgebung RStudio (Version 1.1.383) verwendet.

3. Ergebnisse

Um den Infektionsprozess von *F. graminearum* zu untersuchen, wurden cDNA-Banken des Myzels, der Laufhyphen und der Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und einer infektionsdefizienten Deletionsmutante der Gpmk1 (Δ Gpmk1, FGSG_06385) erstellt. Die durch Sequenzierung der cDNA-Banken erstellten Transkriptome der beiden Pilzstämme wurden in Bezug auf Expression des Genoms von *F. graminearum* (13826 Gene) untersucht. Hierbei wurde der Fokus insbesondere auf die differenzielle Regulation der Gene in den verschiedenen Zelltypen während der Infektion der Wirtspflanze (pflanzen-induzierte (PI) bzw. pflanzen-reprimierte (PR)) und von Genen verschiedener Protein-Kategorien gelegt.

Anhand dieser Analyse wurden Kandidatengene zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung ausgewählt. Es wurden Deletions- und Überexpressionsmutanten verschiedener Gene im Wildtyp 8/1 bzw. der Δ Gpmk1 erstellt und anhand ihres Infektionspotentials auf Weizen (*Triticum aestivum* L.), ihrer Fähigkeit zur asexuellen Reproduktion, ihrer Toleranz gegenüber osmotischem und oxidativem Stress sowie fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Fall der Modifikationen des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese durch die Überexpression der Regulatoren wurde auch die Produktion des Toxins Deoxynivalenol (DON) analysiert und ein Transkriptionsprofil des gesamten Clusters mittels RT-qPCR angefertigt.

3.1 Mutanten-Erstellung: Δ Gpmk1 im Wildtyp 8/1 DsRed

3.1.1 Deletion der Gpmk1 (FGSG_06385) im Wildtyp 8/1

Um die für die cDNA-Bank notwendige Deletionsmutante der Gpmk1 in dem Wildtyp 8/1 DsRed Fluoreszenz-Stamm (Wildtyp 8/1 DsRed; #1526.4.4) zu erstellen, wurde das Gen der Gpmk1 (FGSG_06385) mittels homologer Rekombination durch doppeltes Crossing-Over an Gen-flankierten Bereichen im Genom des Wildtyps 8/1 DsRed durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette (NAT) ersetzt (Abb. 6A). Hierfür wurde unter Verwendung der gDNA einer vorhandenen Deletion der Gpmk1 im *F. graminearum* Wildtyp PH-1 als Template für eine PCR mit den Primern „Gpmk1_KOK_for“ und „Gpmk1_KOK_rev“ (2.2.1.1) das benötigte KO-Konstrukt amplifiziert. Da die NAT-Resistenzkassette mit 2538 bp größer ist als das Gen der Gpmk1 (2411 bp), konnte dieser Größenunterschied von 127 bp nach der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2) gezeigt werden (Abb. 6B). Es wurden drei PCR-Ansätze von 50 μ l über eine Silica-Säule aufgereinigt (2.2.3) und 7 μ g des reinen KO-Konstrukts (Abb. 6C) für die Transformation von *F. graminearum* 8/1 DsRed (2.2.12) eingesetzt.

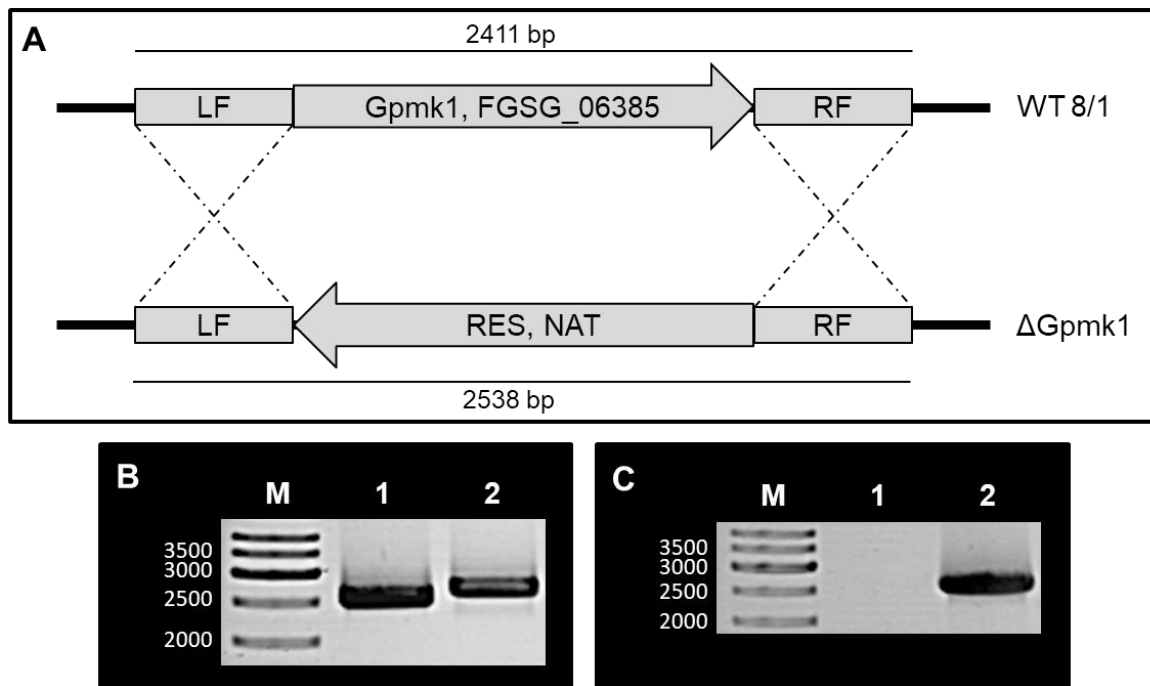


Abb. 6: Konstruktionsstrategie der Δ Gpmk1-Mutante. A: Schema zur KO-Mutanten-Konstruktion. Abschnitt der DNA des Wildtyps 8/1 (WT 8/1) mit dem nativen Locus der Gpmk1 (FGSG_06385) und den angrenzenden Gen-flankierenden Sequenzen der linken (LF) und rechten Flanke (RF) (oben). Durch doppeltes Crossing-Over an den Sequenzen der LF und RF modifizierte DNA der Gpmk1-Deletionsmutante (Δ Gpmk1) (unten). Das Gen der Gpmk1 wurde in den Deletionsmutanten durch die Resistenzkassette für Nourseothricin (RES, NAT) ersetzt. B: PCR zur KO-Konstrukt-Synthese. M: Generuler 1kb, 1: gDNA PH-1, 2: gDNA Δ Gpmk1 PH-1. C: KO-Konstrukt nach der Aufreinigung. M: Generuler 1kb, 1: leer, 2: KO-Konstrukt aus gDNA Δ Gpmk1 PH-1.

3.1.2 Analyse der Gpmk1-Deletionsmutante Δ Gpmk1

Die erhaltenen Transformanten (#1597) wurden auf CM-Festmedium mit einem Nourseothricin-Zusatz von 100 μ g/ml kultiviert (2.2.13) und einer Konidienvereinzellung (2.2.12) unterzogen. Die so selektierten Mutanten wurden mittels diagnostischer PCR (2.2.1.1) und Southern-Blot-Analyse (2.2.16) auf eine erfolgreiche Deletion der Gpmk1 untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche PCRs mit der gDNA der putativen Deletionsmutanten durchgeführt. Die Amplifikation eines Gen-internen, mit den Primern „Gpmk1_int_for“ und „Gpmk1_int_rev“ amplifizierten, Fragments der Gpmk1 (930 bp) zeigte das erwartete Amplikon für den Wildtyp 8/1, für die Transformante #1597.3.1 allerdings wurde ein Fragment von etwa 2500 bp detektiert (Abb. 7C). Durch die zweite PCR mit den Primern „Gpmk1_KOK_for“ und „Gpmk1_KOK_rev“ auf den gesamten modifizierten Bereich (entspricht dem KO-Konstrukt) konnte der erwartete Größenunterschied der Produkte von 127 bp gezeigt werden (Abb. 7D).

Durch den Austausch der Gpmk1 mit der Resistenzkassette wurde eine Erkennungssequenz der Endonuklease *Bgl*II aus dem Genom entfernt. Dies wurde für die Analyse mittels Southern-Blots mit einer Hybridisierung der Sonde auf die linke Genflanke genutzt (PCR-Primer: „Gpmk1_SonLF_for“ und „Gpmk1_SonLF_rev“).

Die Größe des jeweils detektierbaren Fragments lag bei 1336 bp im nativen Genom und bei 3664 bp im Fall einer Deletion des Gpmk1 (Abb. 7A). Der Southern-Blot zeigte die erwarteten Fragmente für den Wildtyp 8/1 und die Transformante #1597.3.1. Zudem konnte eine ektopische Integration des KO-Konstrukts bei der Transformante #1597.2.1 festgestellt werden, da sowohl ein Fragment mit der Größe des Wildtyp 8/1-Genoms als auch ein Fragment mit einer Größe über 8576 bp detektiert werden konnte (Abb. 7B).

Zusammenfassend konnte so die Transformante #1597.3.1 (im Folgenden als Δ Gpmk1 bezeichnet) als eindeutige Deletionsmutante der Gpmk1 identifiziert werden.

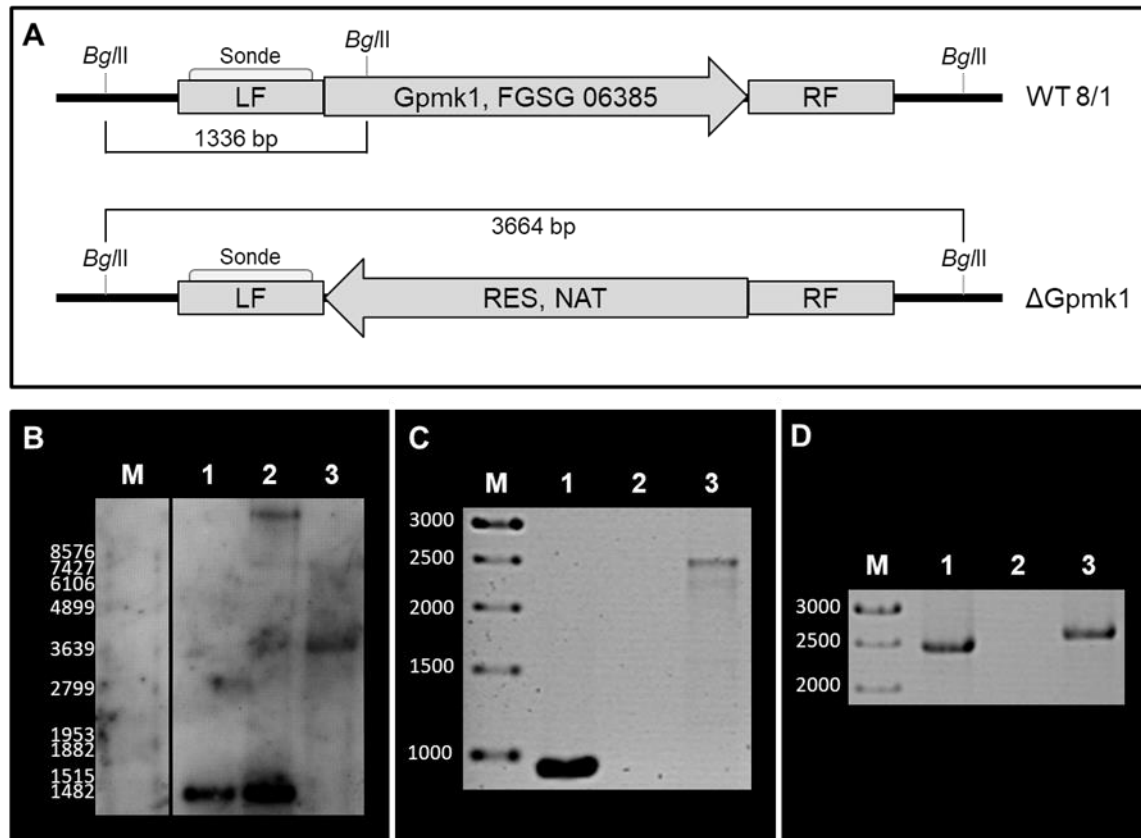


Abb. 7: Analyse der Δ Gpmk1-Mutante. **A:** Theorie zur Southern-Blot-Analyse. Durch die Substitution der Gpmk1 (FGSG_06385) mit einer Resistenzkassette für Nourseothricin (RES, NAT) wurde eine Schnittstelle der Endonuklease *Bgl*II aus der Genomsequenz entfernt. Dies resultiert in einer Änderung der Fragmentgröße bei einem Verdau durch *Bgl*II von 1336 bp auf 3664 bp. Bei einer Southern-Blot Untersuchung auf die linke Flanke (LF) wird diese Größendifferenz von 2328 bp zur Untersuchung der Mutanten verwendet. **B:** Southern-Blot von der Deletion der Gpmk1 (FGSG_06385) in der putativen Δ Gpmk1 Transformante #1597.3.1. Hybridisierung mit Sonde auf linke Flanke (LF). M: DIG-labeled Marker VII, 1: gDNA #1526.4.4 (Wildtyp 8/1 DsRed), 2: #1597.2.1 (Δ Gpmk1 Transformante, Ektop), 3: #1597.3.1 (Δ Gpmk1 Transformante, KO). **C+D:** PCR zur Analyse der putativen Δ Gpmk1 Transformante #1597.3.1: **C:** Synthese eines Gen-internen Fragments der Gpmk1 (FGSG_06385). M: Generuler 1kb, 1: gDNA Wildtyp 8/1 DsRed, 2: H₂O-Kontrolle, 3: gDNA #1597.3.1. **D:** Synthese des gesamten modifizierten Genombereichs (linke Flanke bis rechte Flanke). M: Generuler 1kb, 1: gDNA Wildtyp 8/1 DsRed, 2: H₂O-Kontrolle, 3: gDNA #1597.3.1.

Zur weiteren Analyse der $\Delta Gpmk1$ wurde eine initiale Phänotypisierung in Bezug auf das Infektionsverhalten auf Weizen durchgeführt. In einer Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Nandu' (2.2.17.1) konnte gezeigt werden, dass die $\Delta Gpmk1$ im Gegensatz zum Wildtyp 8/1, welcher die gesamte Ähre infiziert, nur in den Spelzen des inokulierten Ährchens, die direkt in Kontakt mit den Konidien gekommen sind, Läsionen auslöst (Abb. 8A). Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der $\Delta Gpmk1$ (2.2.21) zeigte, dass durch die Mutante trotz Bildung von Infektionsstrukturen auf der Oberfläche von Weizenpaleae keine Infektion der tieferen Zellschichten stattfindet und höchstens ein subcuticuläres Wachstum des Pilzes beobachtet werden konnte (Abb. 8B).

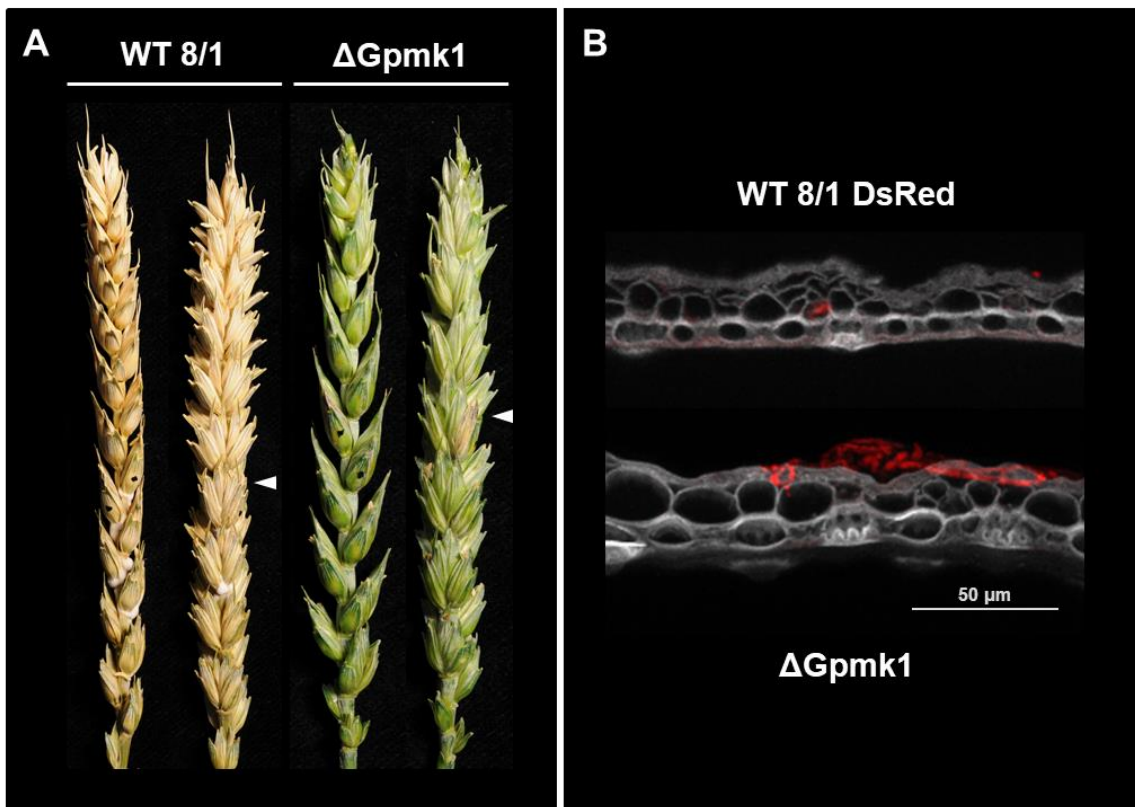


Abb. 8: Infektionsanalyse der $\Delta Gpmk1$ -Mutante. **A:** Infektion von Weizen durch die $\Delta Gpmk1$ -Mutante (21 dpi). Wildtyp 8/1-infizierte Weizenähre (links) und infizierte Ähre mit der $\Delta Gpmk1$ Mutante (#1597.3.1, rechts) jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Für diesen Infektionstest wurde das Weizenkultivar 'Nandu' verwendet. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Querschnitten infizierter Paleae (7 dpi). Wildtyp 8/1 DsRed-infizierte Weizenpalea (oben) und infizierte Palea mit der $\Delta Gpmk1$ Mutante (#1597.3.1, unten). Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz eines konstitutiv und zytoplasmatisch exprimierten DsRed (rot). Maßstab: 50 μm .

3.2 Präparation der cDNA-Banken des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1

3.2.1 Isolation des Pilzmaterials von infizierten Weizen-Paleae mittels LCM

Zur Präparation der cDNA-Banken (2.2.22) wurde Zellmaterial der Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 benötigt. Dieses wurde mittels Laser Capture Mikrodissektion (LCM) von Weizen-Paleae gesammelt (2.2.22.1). Für die Replikate der Laufhyphen (RH) wurde jeweils eine Zellfläche von etwa $0,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (838 Elemente), $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (909 Elemente) und $1,1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (864 Elemente) des Wildtyps 8/1 und eine Zellfläche von etwa $0,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (1295 Elemente), $0,9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (817 Elemente) und $1,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (896 Elemente) der Δ Gpmk1 präpariert. Für die jeweiligen Replikate der Infektionskissen (IC) wurden für alle Proben eine Zellfläche von etwa $0,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ (392 bis 826 Elemente) gesammelt (Tab. 6). Die Anzahl der Elemente ist hierbei nur eine methodische Größe und steht nicht in Zusammenhang mit der Größe der gesammelten Fragmente.

Tab. 6: Anzahl der Elemente und Zellfläche der mittels Laser Capture Mikrodissektion gesammelten Ausgangsproben. Es wurden jeweils drei Replikate von Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) von dem Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1-Mutante präpariert.

Stamm	Zelltyp	Replikat 1		Replikat 2		Replikat 3	
		Anzahl der Elemente	Zellfläche [μm^2]	Anzahl der Elemente	Zellfläche [μm^2]	Anzahl der Elemente	Zellfläche [μm^2]
Wildtyp 8/1 (WT)	Laufhyphen (RH)	864	1181978	838	822687	909	1006078
	Infektionskissen (IC)	655	213535	826	233885	734	220864
Δ Gpmk1 (dG)	Laufhyphen (RH)	896	1295048	817	946970	1295	821006
	Infektionskissen (IC)	386	213230	392	218440	584	194919

3.2.2 Generation der doppelstrang cDNA-Banken durch LD-PCR

Aus den mittels LCM (2.2.22.1) gesammelten Wildtyp 8/1- und Δ Gpmk1-Zellen sowie den jeweiligen Proben des Myzels wurde mRNA isoliert (2.2.22.2). Anschließend wurde die Synthese der Erst-Strang cDNA (2.2.22.3) aus der mRNA der jeweiligen Probe durchgeführt. Mit dieser wurde eine Amplifikation zu ds cDNA in zwei Schritten vorgenommen (2.2.22.4). Im ersten Schritt musste der optimale Zyklus zur Amplifikation ermittelt werden. Für den Wildtyp 8/1 konnten für die Proben des Myzels die Zyklen 20, 25 und 25 ermittelt werden, für die Laufhyphen Zyklus 29, 27 bzw. 27 und für die Infektionskissen die Zyklen 23, 25 und 30 (Abb. 9). Bei den Proben der Δ Gpmk1 wurden für das Myzel die Zyklen 24, 24 und 22 bestimmt, für die Laufhyphen die Zyklen 27, 26 und 27 und für die Infektionskissen die Zyklen 25, 29 und 25 (Abb. 10).

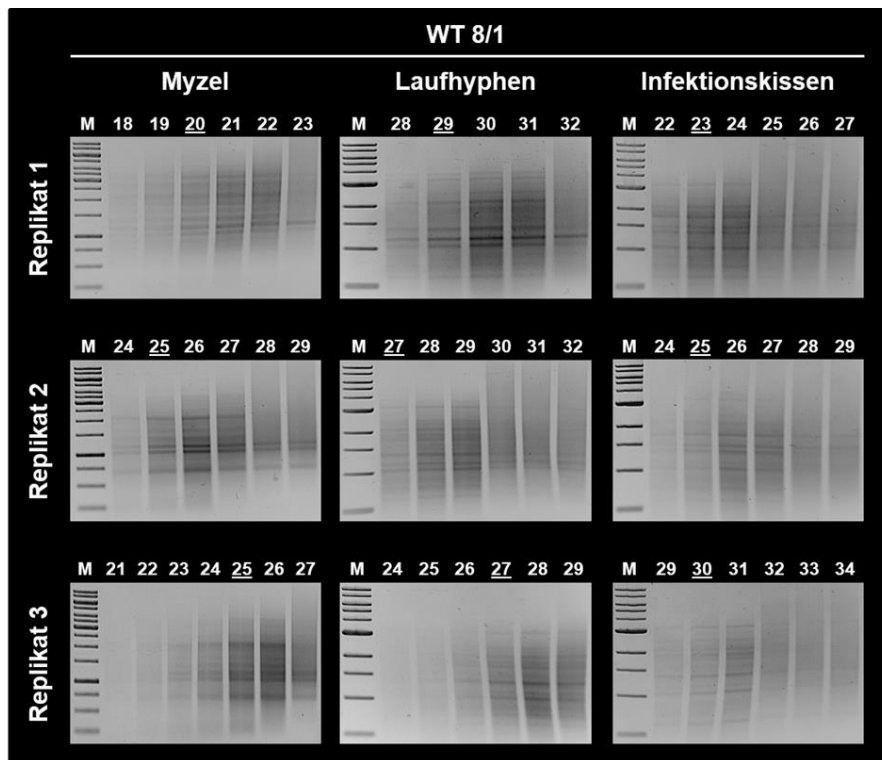


Abb. 9: Long-Distance PCR zur Ermittlung des finalen Amplifikationszyklus zur Erstellung der ds cDNA Banken des Wildtyps 8/1. Es wurden jeweils drei Replikate von Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen angefertigt. Der ermittelte Zyklus für die Erstellung der ds cDNA Banken ist jeweils unterstrichen. M: Generuler 1kb.

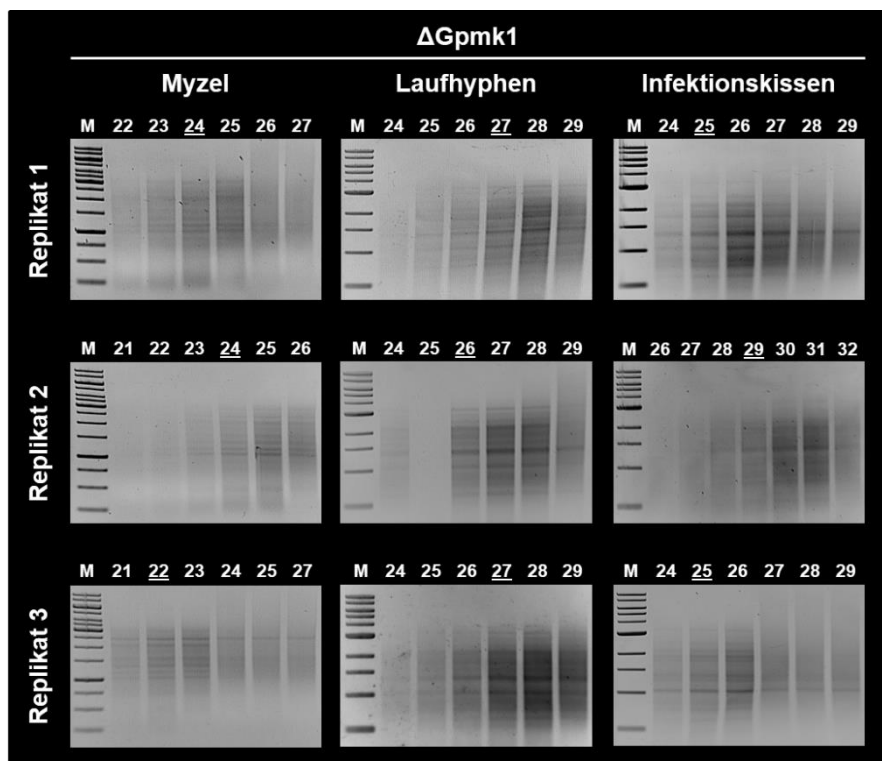


Abb. 10: Long-Distance PCR zur Ermittlung des finalen Amplifikationszyklus zur Erstellung der ds cDNA Banken ΔGpmk1-Mutante. Es wurden jeweils drei Replikate von Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen angefertigt. Der ermittelte Zyklus für die Erstellung der ds cDNA Banken ist jeweils unterstrichen. M: Generuler 1kb.

Nach der finalen Amplifikation (2.2.22.4) und Reinigung der cDNA-Banken (2.2.22.5) wurden diese vor der Illumina-Sequenzierung (2.2.22.6) mittels Gelelektrophorese (2.2.2) einer optischen Qualitätsprüfung unterzogen. Alle Proben außer dem zweiten Replikat der Wildtyp 8/1 Infektionskissen (WT 8/1 IC II) zeigten das zu erwartende leiterartige Bandenmuster (Abb. 11). Die Menge an ds cDNA der nicht sichtbaren Probe war mit insgesamt 104 ng zu gering, um detektiert zu werden. Um weitere Probe zu sparen, wurde die Qualität dieser und der restlichen Proben zusätzlich durch fluorometrische Messung (NanoDrop One; Thermo Fisher Scientific, USA) sichergestellt.

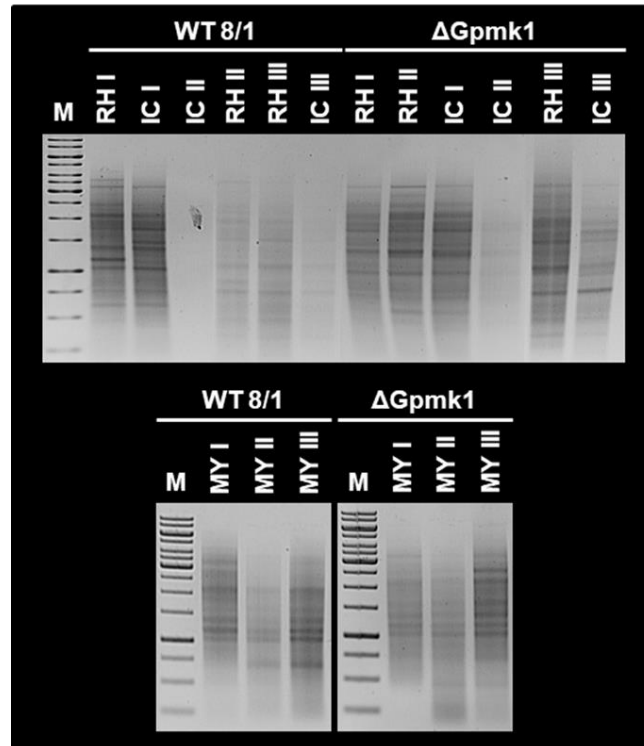


Abb. 11: Finalisierte gereinigte ds cDNA Banken des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1-Mutante. Es wurden jeweils drei Replikate (I bis III) von Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) angefertigt und 3 μ l der Proben mit variierenden DNA-Konzentrationen aufgetragen. M: Generuler 1kb.

3.3 Differenzielle Expressionsanalyse von Infektionskissen, Laufhyphen und axenischer Kultur (Myzel) der *Fusarium graminearum* Mutanten Wildtyp 8/1 DsRed und Δ Gpmk1 (Transkriptom-Analyse)

3.3.1 Sequenzierung und initiale bioinformatische Aufbereitung

3.3.1.1 Aufarbeitung der sequenzierten DNA-Abschnitte

Die cDNA-Banken von Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 wurden mittels Illumina-Verfahren sequenziert (2.2.22.6). Die Gesamtheit der durch die Sequenzierung erfassten DNA-Abschnitte (Reads) beinhaltet im ungefilterten Zustand (Raw Reads) neben den eindeutig sequenzierten DNA-Abschnitten (Clean Reads) auch Sequenzen mit einem hohen Anteil an nicht eindeutig identifizierbaren Nukleinbasen, sowie Sequenzen, welche durch die DNA-Adapter des Sequenzierungsprozesses verunreinigt sind, und DNA-Abschnitte mit einer unzureichenden Sequenzierungsqualität. Für die Zuordnung der Sequenzen auf das Genom des Referenzorganismus *F. graminearum* PH-1 wurden nur die eindeutig identifizierten Sequenzen verwendet (2.2.22.6).

Von den sequenzierten Abschnitten der cDNA-Bank-Replikate des Wildtyps 8/1 konnten jeweils zwischen 81,7 % und 99,9 % für die Zuordnung verwendet werden, von den Replikaten der Δ Gpmk1 jeweils zwischen 79,1 % und 99,9 % (Tab. 7).

Tab. 7: Qualitätsübersicht der bei der Sequenzierung erfassten DNA-Abschnitte. Raw Reads: ungefilterte Gesamtheit der erfassten DNA-Abschnitte, Clean Reads: eindeutig identifizierte DNA-Abschnitte. Rep.: Replikat.

	Rep.	Wildtyp 8/1			Δ Gpmk1		
		Raw Reads [Mbp]	Clean Reads [Mbp]	Anteil [%]	Raw Reads [Mbp]	Clean Reads [Mbp]	Anteil [%]
Myzel	I	78,94	69,88	88,5	76,92	66,32	86,2
	II	83,56	68,24	81,7	83,06	65,69	79,1
	III	82,37	69,95	84,9	79,19	65,79	83,1
Laufhyphen	I	34,84	34,63	99,4	27,80	27,02	97,2
	II	34,09	34,05	99,9	25,14	24,34	96,8
	III	30,81	30,78	99,9	37,19	37,17	99,9
Infektionskissen	I	36,07	35,75	99,1	29,45	28,92	98,2
	II	29,55	29,33	99,3	27,62	27,10	98,1
	III	31,23	31,19	99,9	48,79	48,76	99,9

3.3.1.2 Korrelation der sequenzierten Proben/Replikate

Nach der Zuordnung der eindeutig identifizierten DNA-Abschnitte der Illumina-Sequenzierung zum Referenzgenom von *F. graminearum* PH-1 (2.2.22.6) wurde der Zusammenhang zwischen den Replikaten der jeweiligen Zelltypen von Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 untersucht. Hierfür wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Die für die folgende Analyse des Transkriptionsmusters verwendeten Replikate des Wildtyp 8/1 Myzels hatten eine Korrelationsstärke von 93,8 %, die Replikate der Wildtyp 8/1 Laufhyphen ebenfalls von 93,8 % und die Wildtyp 8/1 Infektionskissen von 95,1 % (Tab. 8). Die Replikate der $\Delta Gpmk1$ korrelierten für das Myzel zu 94,7 %, für die Laufhyphen zu 92,3% und für die Infektionskissen zu 96,1 % (Tab. 8).

Tab. 8: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman der sequenzierten ds cDNA-Banken. Die Korrelationsstärke ist durch einen Farbgradienten von Grün (hoch) zu Rot (niedrig) hervorgehoben. Es sind die zwei Replikate (Rep.) dargestellt, die für die Auswertung der Transkriptome verwendet wurden.

			Wildtyp 8/1						$\Delta Gpmk1$					
			Myzel		Laufhyphen		Infektionskissen		Myzel		Laufhyphen		Infektionskissen	
			Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2
Wildtyp 8/1	Myzel	Rep. 1	1,000	0,938	0,836	0,815	0,790	0,750	0,862	0,857	0,806	0,769	0,774	0,772
		Rep. 2	0,938	1,000	0,864	0,844	0,823	0,777	0,859	0,860	0,819	0,805	0,810	0,810
	Laufhyphen	Rep. 1	0,836	0,864	1,000	0,938	0,917	0,879	0,819	0,817	0,870	0,850	0,878	0,892
		Rep. 2	0,815	0,844	0,938	1,000	0,947	0,918	0,824	0,822	0,898	0,885	0,908	0,921
	Infektionskissen	Rep. 1	0,790	0,823	0,917	0,947	1,000	0,951	0,795	0,793	0,873	0,873	0,907	0,917
		Rep. 2	0,750	0,777	0,879	0,918	0,951	1,000	0,762	0,741	0,859	0,848	0,881	0,894
$\Delta Gpmk1$	Myzel	Rep. 1	0,862	0,859	0,819	0,824	0,795	0,762	1,000	0,947	0,833	0,811	0,785	0,793
		Rep. 2	0,857	0,860	0,817	0,822	0,793	0,741	0,947	1,000	0,842	0,827	0,789	0,796
	Laufhyphen	Rep. 1	0,806	0,819	0,870	0,898	0,873	0,859	0,833	0,842	1,000	0,923	0,902	0,913
		Rep. 2	0,769	0,805	0,850	0,885	0,873	0,848	0,811	0,827	0,923	1,000	0,901	0,909
	Infektionskissen	Rep. 1	0,774	0,810	0,878	0,908	0,907	0,881	0,785	0,789	0,902	0,901	1,000	0,961
		Rep. 2	0,772	0,810	0,892	0,921	0,917	0,894	0,793	0,796	0,913	0,909	0,961	1,000

3.3.2 Genregulation während des frühen Infektionsprozesses auf Weizen

Das Transkriptionsmuster der insgesamt 13826 angenommenen Gene von *F. graminearum* wurde zwischen den drei Zelltypen Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ verglichen.

3.3.2.1 Grundsätzliche Transkription der Gene von *F. graminearum*

Die Analyse auf grundsätzliche Transkription eines Gens zeigte, dass im Myzel des Wildtyps 8/1 11262 (81 %) Gene transkribiert werden, in den Laufhyphen 11777 (85 %) Gene und in den Infektionskissen 12503 (90 %) Gene. 10720 (78 %) Gene werden in allen drei Zelltypen und 1019 (7 %) Gene in keinem Zelltyp des Wildtyps 8/1 transkribiert (Abb. 12).

Im Myzel der $\Delta Gpmk1$ werden 12078 (87 %), in den Laufhyphen 11996 (87 %) Gene und in den Infektionskissen 12470 (90 %) Gene exprimiert. In keinem der drei Zelltypen werden 823 (6 %) Gene transkribiert und 11241 (81 %) Genen in allen Zelltypen (Abb. 12).

Eine stammübergreifende Betrachtung des Transkriptionsmusters der Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 zeigt, dass insgesamt 10374 (75 %) Gene grundsätzlich transkribiert werden, 2834 (21 %) mindestens in einem Zelltyp einer der beiden Stämme und 618 (4 %) Gene in keiner der untersuchten Entwicklungsperioden transkribiert werden (Abb. 12).

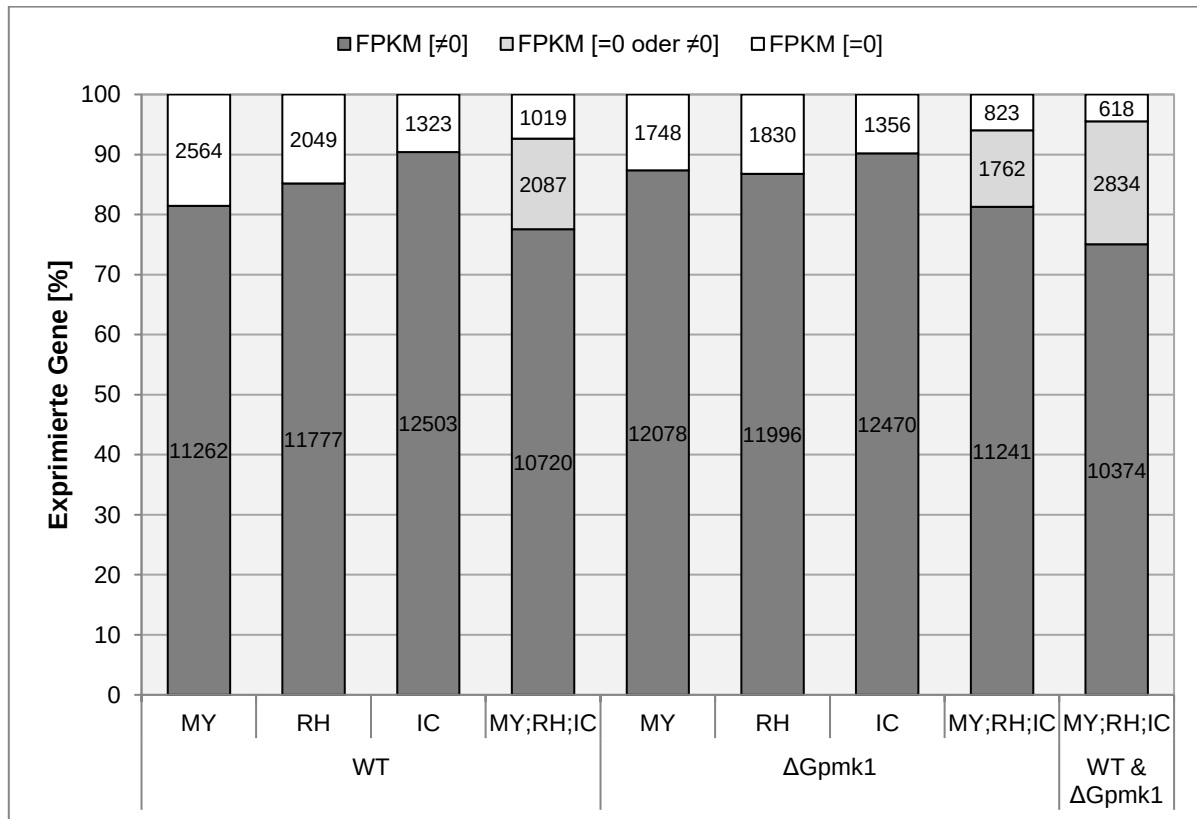


Abb. 12: Grundsätzliche Transkription der Gene von *F. graminearum* in den drei Zelltypen. Transkribierte Gene in den verschiedenen Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH), Infektionskissen (IC) sowie in allen drei Zelltypen transkribierte Gene (MY;RH;IC) im Wildtyp 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 bzw. beiden Stämmen (WT & Δ Gpmk1). Exprimierte Gene sind in Dunkelgrau (FPKM [≠0]), nicht exprimierte Gene in Weiß (FPKM [=0]) und Gene, die in mindestens einem Zelltyp exprimiert wurden, in hellgrau (FPKM [=0 oder ≠0]). Die Angaben in den Säulen sind die absolute Anzahl der jeweiligen Gene. FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped.

3.3.2.2 Differenzielle Expression der Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1

Zum differenziellen Vergleich der Genexpression von *F. graminearum* wurden Gene, die einen Grad der Veränderung des binären Logarithmus der FPKM-Werte ($\log_2$ Fold Change, $\log_2$ FC) mit einem Wert von über oder gleich +2 ($\log_2$ FC $\geq$ +2) aufwiesen, als „hochreguliert“ (up) bezeichnet. Gene mit einem $\log_2$ FC in dem Wertebereich zwischen +2 und -2 ($\log_2$ FC (-2, +2)) wurden als „nicht differenziell reguliert“ (non) und Gene mit einem $\log_2$ FC mit einem Wert von weniger oder gleich -2 ($\log_2$ FC $\leq$ -2) als „herunterreguliert“ (down) definiert.

Um einen Überblick über die Verteilung der potentiell differenziell regulierten Gene (DEG) zu bekommen, wurde eine vergleichende Drei-Schritt-Analyse zwischen Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen des jeweiligen Stamms durchgeführt (Abb. 13).

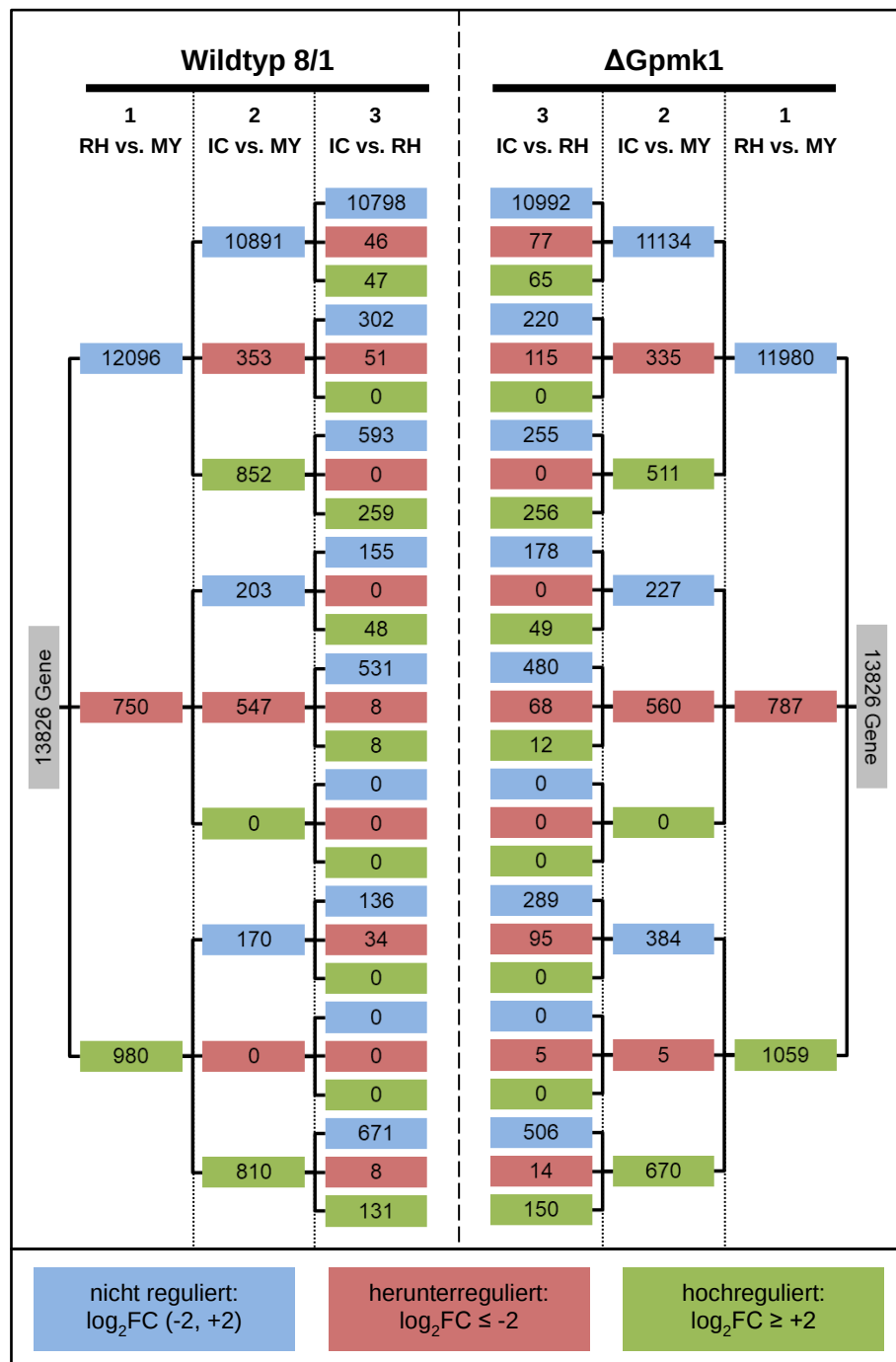


Abb. 13: Transkription der Gene von *F. graminearum* im Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$. Drei-Schritt-Vergleich der drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) jeweils vom Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$. Durchgeführte Vergleiche: (1) RH vs. MY, (2) IC vs. MY und (3) IC vs. RH. Blaue Boxen: nicht regulierte Gene ($\log_2FC (-2, +2)$), rote Boxen: herunterregulierte Gene ($\log_2FC \leq -2$), grüne Boxen: hochregulierte Gene ($\log_2FC \geq +2$). Die Regulation bezieht sich stets auf den erstgenannten Vergleichspartner.

Der erste Vergleich (Abb. 13, (1)) der Transkription der insgesamt 13826 Gene von *F. graminearum* wurde zwischen Laufhyphen und Myzel durchgeführt. Im Wildtyp 8/1 wurden 12096 (87,5 %) Gene als nicht differenziell reguliert, 750 (5,4 %) Gene als herunterreguliert in den Laufhyphen und 980 (7,1 %) Gene als hochreguliert in den Laufhyphen identifiziert. Für die $\Delta Gpmk1$ wurden 11980 (86,6 %) Gene als nicht differenziell reguliert, 787 (5,7 %) Gene als in den Laufhyphen herunterreguliert und 1059 (7,7 %) Gene als in den Laufhyphen hochreguliert eingeteilt.

Im zweiten Schritt (Abb. 13, (2)) wurde die Transkription der Gene in Infektionskissen und Myzel verglichen. Insgesamt sind im Wildtyp 8/1 11264 (81,5 %) Gene nicht differenziell reguliert, 900 (6,5 %) Gene in den Infektionskissen herunterreguliert und 1662 (12 %) Gene in den Infektionskissen hochreguliert. In der Δ Gpmk1 wurden 11745 (84,9 %) Gene als nicht differenziell reguliert, 900 (6,5 %) Gene in den Infektionskissen herunterreguliert und 1181 (8,5 %) Gene in den Infektionskissen hochreguliert.

Im letzten und dritten Vergleich (Abb. 13, (3)) wurde die Transkription der Gene in den Infektionskissen und den Laufhyphen betrachtet. Die Analyse zeigte, dass im Wildtyp 8/1 insgesamt 13186 (95,4 %) Gene nicht differenziell reguliert, 147 (1,1 %) Gene in den Infektionskissen herunterreguliert und 493 (3,6 %) Gene in den Infektionskissen hochreguliert sind. In der Δ Gpmk1 wurden 12920 (93,4 %) Gene als nicht differenziell reguliert, 374 (2,7 %) Gene als in den Infektionskissen herunterreguliert und 532 (3,8 %) Gene als in den Infektionskissen hochreguliert identifiziert.

Zusammenfassend ist die Anzahl der regulierten Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 größtenteils identisch. Allerdings ist im Wildtyp 8/1 die Anzahl der Gene, die im Vergleich mit dem Myzel in den Infektionskissen hochreguliert sind, um etwa ein Drittel höher als in der Δ Gpmk1. Die Anzahl der Gene, die im Vergleich von Infektionskissen und Laufhyphen in den Infektionskissen herunterreguliert sind, ist hingegen in der Δ Gpmk1 um etwa das 2,5-fache erhöht.

3.3.2.3 Pflanzlich bedingte Genregulation während der Infektion (pflanzen-regulierte Gene)

Um die transkriptionelle Expression der Gene in Abhängigkeit zum Wachstum von *F. graminearum* auf der Wirtspflanze zu betrachten, wurde die Genregulation im axenisch kultiviertem Myzel mit der in Laufhyphen und Infektionskissen verglichen. Die Gene wurden in die folgenden drei Kategorien eingeteilt: Gene mit unveränderter Regulation auf Pflanzengewebe („NPR“; Drei-Schritt-Analyse (Abb. 13): RH vs. MY (1) und IC vs. MY (2): „non“/blau), Gene mit reprimierter Regulation auf der Wirtspflanze (pflanzen-reprimiert, „PR“; Drei-Schritt-Analyse (Abb. 13): RH vs. MY (1) oder IC vs. MY (2): „down“/rot und niemals „up“/grün) und Gene, deren Regulation auf pflanzlichem Gewebe verstärkt ist (pflanzen-induziert, „PI“; Drei-Schritt-Analyse (Abb. 13): RH vs. MY (1) oder IC vs. MY (2): „up“/grün).

Im Wildtyp 8/1 sind insgesamt 10891 (79 %) Gene und in der Δ Gpmk1 insgesamt 11134 (80 %) Gene in ihrer Regulation auf der Pflanze unverändert. Davon sind 9644 (70 %) in beiden Stämmen nicht alternativ reguliert (Tab. 9). Eine im Vergleich zum Myzel verringerte Transkription zeigen im Wildtyp 8/1 1103 (8 %) Gene und in der Δ Gpmk1 1122 (8 %) Gene. In diesem Fall waren 422 (3 %) Gene in beiden Stämmen auf der Pflanze reprimiert (Tab. 9).

Pflanzen-induziert sind im Wildtyp 8/1 1832 (13 %) Gene und in der Δ Gmpk1 1570 (12 %) Gene. In beiden Stämmen sind 852 (6 %) Gene durch das Wachstum auf der Pflanze verstärkend reguliert (Tab. 9).

Eine gegensätzliche Regulation im Wildtyp 8/1 und der Δ Gmpk1 zeigte nur ein sehr kleiner Anteil von Genen. Im Wildtyp 8/1 pflanzen-induziert und in der Δ Gmpk1 pflanzen-reprimiert waren 102 (1 %) Gene und in der Δ Gmpk1 pflanzen-induziert und im Wildtyp 8/1 pflanzen-reprimiert nur 69 (0,5 %) Gene (Tab. 9).

Tab. 9: Übersicht über pflanzen-regulierte Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gmpk1. NPR: Gene mit unveränderter Regulation, PR: Gene mit pflanzen-reprimierter Regulation, PI: Gene mit pflanzen-induzierter Regulation, Abs.: Absolute Anzahl der Gene, Rel.: Prozentualer Anteil der Gene relativ zum Gesamtgenom (13826 Gene).

Wildtyp 8/1	ΔGpmk1						Σ	Σ [%]
	NPR		PR		PI			
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.		
NPR	9644	70 %	598	4 %	649	5 %	10891	79 %
PR	612	4 %	422	3 %	69	0,5 %	1103	8 %
PI	878	6 %	102	1 %	852	6 %	1832	13 %
Σ	11134		1122		1570		13826	
Σ [%]	80 %		8 %		12 %		100 %	

3.3.2.3.1 Funktionale Kategorisierung der pflanzen-regulierten Genexpression

Zur tieferen Analyse der Auswirkungen durch eine unterschiedliche Regulation der Gene wurden diese anhand der Funktion ihrer codierten Proteine in Kategorien eingeteilt (2.2.23). Sie wurden funktionsübergreifend in nicht-sekretierte Proteine (non SP) und sekretierte Proteine (SP) unterteilt. Die folgenden Funktionen wurden zur Einteilung der Gene herangezogen: Transkriptionsfaktoren (TF), Transporterproteine (TP), Histon-modifizierende Proteine (HM), Proteinkinasen/-phosphatasen (PK), Dehydrogenasen (DH), kohlenhydrataktive Enzyme (CAZy), putative Effektorproteine (PE), Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten (SMC).

Die 10891 nicht pflanzen-regulierten Gene im Wildtyp 8/1 codieren insgesamt 9963 (90 %) nicht-sekretierte und 1104 (10 %) sekretierte Proteine. Dabei sind die meisten nicht-sekretierten Proteine TF (797 Gene, 8 %), RRE (638 Gene, 6 %), TP (490 Gene, 5 %) und Proteine, die bisher keiner Funktion zuzuordnen sind (7352 Gene, 74 %). Unter den sekretierten Proteinen sind vor allem PE (355 Gene, 32 %), CAZy (140 Gene, 13 %), RRE (111 Gene, 10 %) und Proteine ohne Annotation (480 Gene, 43 %) (Tab. 10).

Von den 1103 pflanzen-reprimierten Genen im Wildtyp 8/1 codieren 968 (85 %) nicht-sekretierte Proteine und 165 (15 %) sekretierte Proteine. Die höchste Anzahl der nicht-sekretierten Proteine sind RRE (73 Gene, 8 %), TP (63 Gene, 7 %), TF (59 Gene, 6 %) und funktional nicht beschriebene Proteine (697 Gene, 72 %).

Die meisten sekretierten Proteine haben eine Funktion als PE (48 Gene, 26 %), CAZy (19 Gene, 12 %), RRE (10 Gene, 6 %) oder sind Proteine mit unbekannter Funktion (87 Gene, 53 %) (Tab. 10).

Die 1832 pflanzen-induzierten Gene im Wildtyp 8/1 teilen sich in 1451 (77 %) nicht-sekretierte Proteine und 441 (23 %) sekretierte Proteine. Von den nicht-sekretierten Proteinen sind die meisten RRE (187 Gene, 13 %), TP (124 Gene, 9 %), DH (54 Gene, 4 %) und Proteine ohne bekannte Funktion (969 Gene, 67 %). Die sekretierten Proteine haben größtenteils eine Funktion als CAZy (129 Gene, 29 %), PE (121 Gene, 27 %), RRE (54 Gene, 12 %) oder sind Proteine, deren Funktion nicht annotiert ist (132 Gene, 30 %) (Tab. 10).

Tab. 10: Funktionale Aufstellung der pflanzen-regulierten Gene im Wildtyp 8/1. Die farbcodierten Heatmaps basieren auf der Anzahl der Gene pro Funktion innerhalb eines Abschnitts; Skalierung von Grün (höchster Wert) zu Rot (niedrigster Wert). Da Gene Proteine mit mehreren Funktionen codieren können, ist deren Anzahl (14092) höher als die Anzahl der Gene im Genom (13826). Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PR: Pflanzen-reprimiert, PI: Pflanzen-induziert, Non SP: nicht-sekretierte Proteine, SP: sekretierte Proteine, TF: Transkriptionsfaktoren, TP: Transporterproteine, HM: Histon-modifizierende Proteine, DH: Dehydrogenasen, PK: Proteinkinasen/-phosphatasen, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, PE: putative Effektorproteine, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, GPCR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, no: Gene ohne Annotation, MY: Myzel, RH: Lauffhyphen, IC: Infektionskissen, non: nicht regulierte Gene, down: herunterregulierte Gene, up: hochregulierte Gene.

WT_RH vs. WT_MY	WT_IC vs. WT_MY	WT_IC vs. WT_RH	Pfl.- Reg.	Nicht-sekretierte Proteine										Sekretierte Proteine										non SP		SP		Σ
				TF	TP	HM	PK	DH	CAZY	PE	RRE	GPCR	no	TF	TP	HM	PK	DH	CAZY	PE	RRE	GPCR	no	Σ	Σ			
non	non	non	NPR	791	484	85	187	162	166	0	635	78	7299	6	2	0	3	6	135	351	110	0	474	9887	1087	10974		
non	non	down	NPR	3	2	0	0	1	2	0	1	2	28	0	0	0	0	0	1	3	1	0	2	39	7	46		
non	non	up	NPR	3	4	1	0	2	0	0	2	0	25	0	0	1	0	0	4	1	0	0	4	37	10	47		
Σ Pflanzen-Regulation: NPR				797	490	86	187	165	168	0	638	80	7352	6	2	1	3	6	140	355	111	0	480	9963	1104	11067		
Σ Pflanzen-Regulation: NPR [%]				8	5	1	2	2	2	0	6	1	74	1	0	0	0	1	13	32	10	0	43	90%	10%	79%		
non	down	non	PR	28	19	2	9	9	5	0	16	4	189	0	0	0	0	0	3	4	1	0	21	281	29	310		
non	down	down	PR	1	3	0	0	2	0	0	7	1	30	0	0	0	0	0	2	3	1	0	3	44	9	53		
non	down	up	PR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
down	non	non	PR	9	5	2	0	5	4	0	15	0	91	0	0	0	0	1	4	9	2	0	13	131	29	160		
down	non	down	PR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
down	non	up	PR	0	3	0	0	1	1	0	4	0	32	0	0	0	0	0	1	4	0	0	4	41	9	50		
down	down	non	PR	19	32	2	2	4	12	0	31	11	343	0	0	0	0	0	9	28	6	0	45	456	88	544		
down	down	down	PR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	1	8		
down	down	up	PR	2	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8		
Σ Pflanzen-Regulation: PR				59	63	6	11	21	22	0	73	16	697	0	0	0	0	1	19	48	10	0	87	968	165	1133		
Σ Pflanzen-Regulation: PR [%]				6	7	1	1	2	2	0	8	2	72	0	0	0	0	1	12	29	6	0	53	85%	15%	8%		
down	up	non	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
down	up	down	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
down	up	up	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
non	up	non	PI	9	30	3	3	13	8	0	66	14	377	0	0	0	0	1	16	20	8	0	37	523	82	605		
non	up	down	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
non	up	up	PI	5	21	3	2	6	3	0	23	5	126	0	0	0	0	2	18	22	14	0	14	194	70	264		
up	non	non	PI	5	11	0	0	6	3	0	7	2	78	0	0	0	0	1	2	6	4	0	14	112	27	139		
up	non	down	PI	0	2	0	0	0	1	0	4	0	19	0	0	0	0	0	4	1	0	4	26	9	35			
up	non	up	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
up	down	non	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
up	down	down	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
up	down	up	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
up	up	non	PI	8	53	3	0	21	16	0	74	11	333	1	0	0	0	0	64	46	21	0	49	519	181	700		
up	up	down	PI	1	1	0	0	0	1	0	2	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	8	2	10		
up	up	up	PI	1	6	2	3	8	3	0	11	2	33	0	0	0	0	0	28	23	5	0	14	69	70	139		
Σ Pflanzen-Regulation: PI				29	124	11	8	54	35	0	187	34	969	1	0	0	0	4	129	121	54	0	132	1451	441	1892		
Σ Pflanzen-Regulation: PI [%]				2	9	1	1	4	2	0	13	2	67	0	0	0	0	1	29	27	12	0	30	77%	23%	13%		

In der Δ Gpmk1 ist die Regulation von 11134 Genen auf der Pflanze unverändert, davon codieren 10240 (91 %) Gene für nicht-sekretierte Proteine und 1065 (9 %) Gene für sekretierte Proteine. Die meisten nicht-sekretierten Proteine sind TF (796 Gene, 8 %), RRE (649 Gene, 6 %), TP (455 Gene, 4 %) und Proteine ohne eine bekannte Funktion (7659 Gene, 75 %). Die sekretierten Proteine haben meist eine Funktion als PE (341 Gene, 32 %), CAZy (131 Gene, 12 %), RRE (98 Gene, 9 %) oder sind bisher nicht annotiert (476 Gene, 45 %) (Tab. 11).

Von den 1122 pflanzen-reprimierten Genen in der Δ Gpmk1 sind 974 (84 %) codierte Proteine nicht-sekretiert und 187 (16 %) sekretiert. Die meisten nicht-sekretierten Proteine fungieren als RRE (100 Gene, 10 %), TP (76 Gene, 8 %), TF (40 Gene, 4 %) oder haben keine Annotation (663 Gene, 68 %). Unter den sekretierten Proteinen sind vor allem PE (57 Gene, 30 %), RRE (23 Gene, 12 %), CAZy (21 Gene, 11 %) und Proteine unbekannter Funktion (83 Gene, 44 %) (Tab. 11).

Die 1570 pflanzen-induzierten Gene in der Δ Gpmk1 codieren 1168 (72 %) nicht-sekretierte Proteine und 458 (28 %) sekretierte Proteine. Der größte Teil der nicht-sekretierten Proteine sind RRE (149 Gene, 13 %), TP (146 Gene, 13 %), TF (49 Gene, 4 %) und Proteine, deren Funktion nicht bekannt ist (696 Gene, 60 %). Die sekretierten Proteine sind hauptsächlich CAZy (136 Gene, 30 %), PE (126 Gene, 28 %), RRE (54 Gene, 12 %) und nicht annotierte Proteine (140 Gene, 31 %) (Tab. 11).

In einem Vergleich des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 zeigt sich, dass die Regulation der Gene größtenteils identisch verteilt ist. Die größten Unterschiede sind bei den sekretierten pflanzen-reprimierten RRE (WT 8/1: 10 Gene, 6 %; Δ Gpmk1: 23 Gene, 12 %) und den nicht-sekretierten pflanzen-induzierten TF (WT 8/1: 29 Gene, 2 %; Δ Gpmk1: 49 Gene, 4 %) zu erkennen (Tab. 11).

Tab. 11: Funktionale Aufstellung der pflanzen-regulierten Gene in der Δ Gpmk1. Die farbcodierten Heatmaps basieren auf der Anzahl der Gene pro Funktion innerhalb eines Abschnitts; Skalierung von Grün (höchster Wert) zu Rot (niedrigster Wert). Da Gene Proteine mit mehreren Funktionen codieren können, ist deren Anzahl (14092) höher als die Anzahl der Gene im Genom (13826). Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PR: Pflanzen-reprimiert, PI: Pflanzen-induziert, Non SP: nicht-sekretierte Proteine, SP: sekretierte Proteine, TF: Transkriptionsfaktoren, TP: Transporterproteine, HM: Histon-modifizierende Proteine, DH: Dehydrogenasen, PK: Proteinkinasen/-phosphatasen, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, PE: putative Effektorproteine, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, GPCR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, no: Gene ohne Annotation, MY: Myzel, RH: Laufhyphen, IC: Infektionskissen, non: nicht regulierte Gene, down: herunterregulierte Gene, up: hochregulierte Gene. Die Regulation bezieht sich stets auf den erstgenannten Vergleichspartner.

dG_RH vs. dG_MY	dG_IC vs. dG_MY	dG_IC vs. dG_RH	Pfl.- Reg.	Nicht-sekretierte Proteine										Sekretierte Proteine										non SP		SP	Σ
				TF	TP	HM	PK	DH	CAZY	PE	RRE	GPCR	no	TF	TP	HM	PK	DH	CAZY	PE	RRE	GPCR	no	Σ	Σ		
non	non	non	NPR	788	441	85	185	160	159	0	629	78	7586	5	2	1	3	8	126	336	94	0	473	10111	1048	11159	
non	non	down	NPR	3	10	0	1	1	1	0	10	2	42	0	0	0	0	0	2	3	2	0	1	70	8	78	
non	non	up	NPR	5	4	0	1	3	3	0	10	2	31	0	0	0	0	0	3	2	2	0	2	59	9	68	
Σ Pflanzen-Regulation: NPR				796	455	85	187	164	163	0	649	82	7659	5	2	1	3	8	131	341	98	0	476	10240	1065	11305	
Σ Pflanzen-Regulation: NPR [%]				8	4	1	2	2	2	0	6	1	75	0	0	0	0	1	12	32	9	0	45	91%	9%	80%	
non	down	non	PR	11	17	1	2	4	4	0	16	5	147	0	0	0	0	0	4	6	3	0	5	207	18	225	
non	down	down	PR	0	8	0	1	5	1	0	16	3	67	1	0	0	0	0	4	5	0	0	8	101	18	119	
non	down	up	PR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
down	non	non	PR	9	10	3	2	5	2	0	18	2	112	1	0	0	0	0	1	6	4	0	11	163	23	186	
down	non	down	PR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
down	non	up	PR	1	4	1	1	1	0	0	4	1	23	0	0	0	0	0	1	2	2	0	9	36	14	50	
down	down	non	PR	18	34	2	7	18	8	0	42	7	285	0	0	0	0	1	9	21	11	0	36	421	78	499	
down	down	down	PR	1	1	0	0	1	4	0	4	3	26	0	0	0	0	0	2	14	3	0	11	40	30	70	
down	down	up	PR	0	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	6	6	12	
Σ Pflanzen-Regulation: PR				40	76	8	13	34	19	0	100	21	663	2	0	0	0	1	21	57	23	0	83	974	187	1161	
Σ Pflanzen-Regulation: PR [%]				4	8	1	1	3	2	0	10	2	68	1	0	0	0	1	11	30	12	0	44	84%	16%	8%	
down	up	non	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
down	up	down	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
down	up	up	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
non	up	non	PI	14	23	3	1	9	8	0	21	11	111	0	0	0	0	0	23	17	9	0	19	201	68	269	
non	up	down	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
non	up	up	PI	10	31	0	1	9	14	0	26	3	89	0	0	0	0	2	26	22	9	0	24	183	83	266	
up	non	non	PI	11	18	2	0	4	1	0	30	2	201	0	0	0	0	0	3	3	3	0	15	269	24	293	
up	non	down	PI	2	7	2	0	3	0	0	10	0	56	0	0	0	0	0	4	3	0	11	80	18	98		
up	non	up	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
up	down	non	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
up	down	down	PI	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	1	5	5	
up	down	up	PI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
up	up	non	PI	8	43	3	4	15	12	0	53	9	210	0	0	0	0	0	35	65	19	0	52	357	171	528	
up	up	down	PI	0	2	0	0	1	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	10	4	14	
up	up	up	PI	3	22	0	0	1	8	0	9	2	19	0	0	0	0	0	49	14	11	0	15	64	89	153	
Σ Pflanzen-Regulation: PI				49	146	10	6	42	43	0	149	27	696	0	0	0	0	2	136	126	54	0	140	1168	458	1626	
Σ Pflanzen-Regulation: PI [%]				4	13	1	1	4	4	0	13	2	60	0	0	0	0	0	30	28	12	0	31	72%	28%	12%	

3.3.2.3.2 Transkriptionsmuster der pflanzen-regulierten Geneexpression

Die transkriptionelle Verteilung der pflanzen-regulierten Gene im Myzel, den Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 wurde in zwei Heatmaps dargestellt. Diese zeigen die Gesamtheit der pflanzen-reprimierten (Abb. 14) und pflanzen-induzierten (Abb. 15) Gene und die jeweils zehn im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 am stärksten regulierten Gene („Top 10“).

Definitionsgemäß sind die pflanzen-reprimierten Gene im Myzel gegenüber den anderen Zelltypen überrepräsentiert. Insgesamt sind 1803 Gene daher entweder im Wildtyp 8/1 oder der Δ Gpmk1 beim Wachstum auf der Pflanze im Vergleich zum Myzel reprimiert.

Sowohl beim Wildtyp 8/1 als auch der $\Delta Gpmk1$ ist eine kleine Gruppe von Genen wesentlich stärker im jeweils anderen Stamm exprimiert (Abb. 14).

Im Myzel des Wildtyps 8/1 sind unter den Top 10 ausschließlich Gene, die hypothetische Proteine codieren. Davon sind drei sekretiert und zeigen zusätzlich PE-Charakteristika. Eines davon (FGSG_15182) hat die stärkste relative Expression und ist auch das Gen mit der viert stärksten Expression in der $\Delta Gpmk1$ (Abb. 14).

Im Myzel der $\Delta Gpmk1$ sind unter den Top 10 neun Gene für hypothetische Proteine und ein Gen (FGSG_03048) codiert eine sekretierte dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase. Dies ist auch das am stärksten regulierte Gen. Vier weitere Proteine werden sekretiert, von denen drei PE sind. Eines der hypothetischen Proteine (FGSG_10688) ist sowohl im Wildtyp 8/1 als auch der $\Delta Gpmk1$ stark im Myzel hochreguliert (Abb. 14).

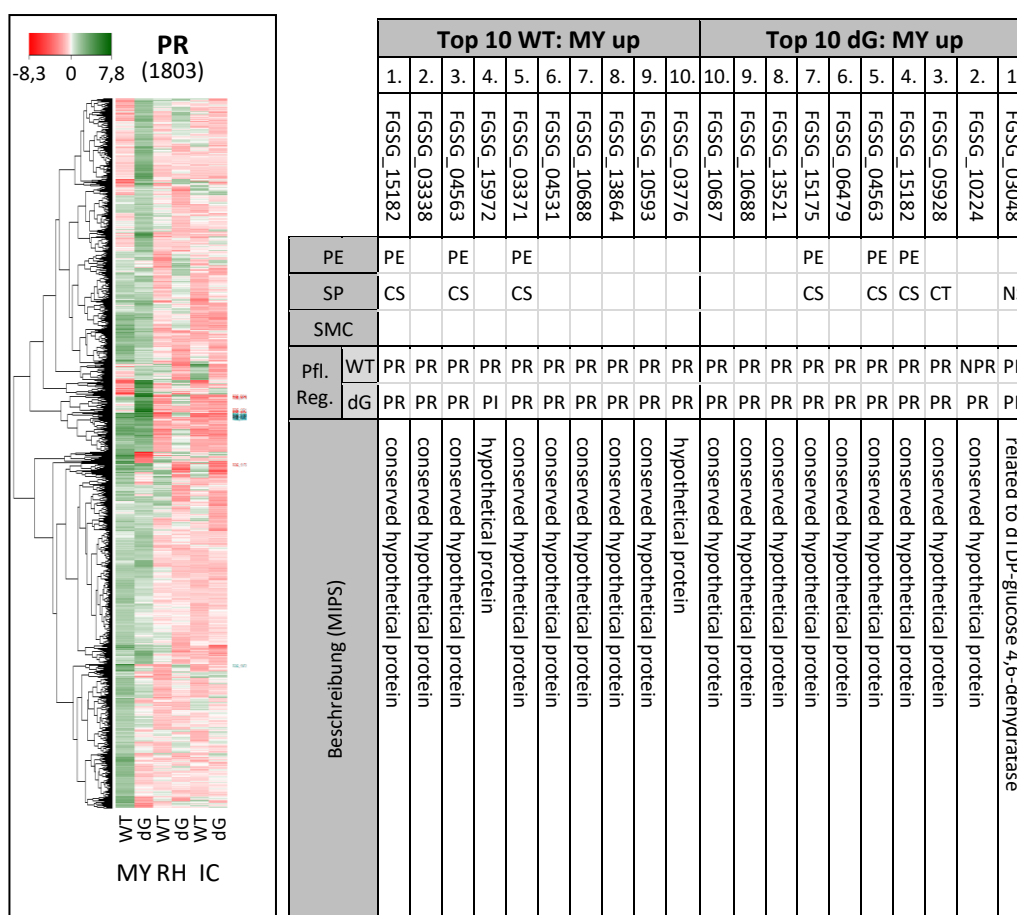


Abb. 14: Transkriptionsmuster pflanzen-reprimierter Gene in Wildtyp 8/1 und $\Delta Gpmk1$. Die Heatmap zeigt die Verteilung der pflanzen-reprimierten Gene (PR) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der $\Delta Gpmk1$ (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn am stärksten hochregulierten Gene im Myzel beider Stämme sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die $\Delta Gpmk1$ in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

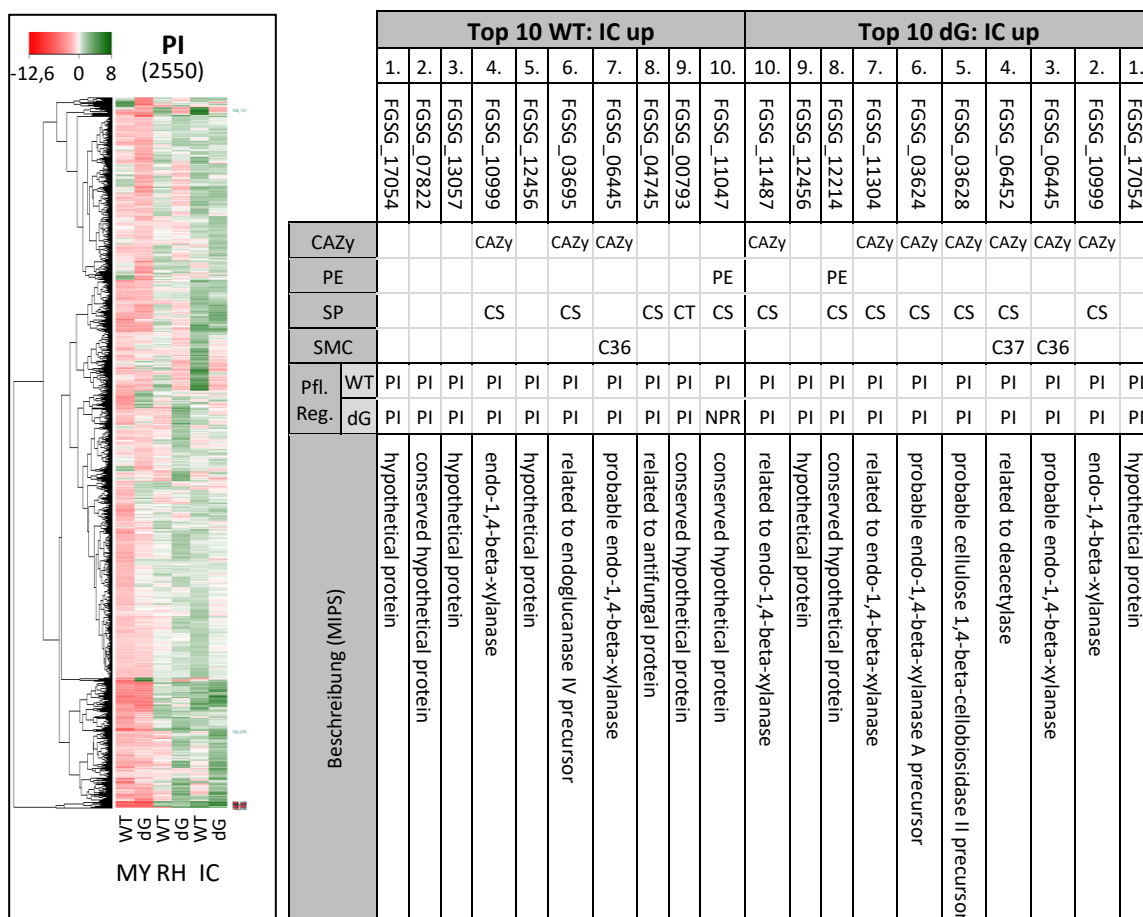


Abb. 15: Transkriptionsmuster pflanzen-induzierter Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gmpk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der pflanzen-induzierten Gene (PR) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn am stärksten hochregulierten Gene in den Infektionskissen beider Stämme sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Eine auf der Pflanze induzierte Expression zeigen insgesamt 2550 Gene im Wildtyp 8/1 oder der Δ Gmpk1. Diese sind im Myzel beider Stämme größtenteils unterrepräsentiert und in den Infektionskissen der zwei Stämme gleichmäßig exprimiert. Eine Gengruppe ist in den Laufhyphen der Δ Gmpk1 deutlich stärker vertreten, als in den Hyphen des Wildtyps 8/1. Eine weitere Gruppe von Genen wird allerdings in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 stärker transkribiert (Abb. 15).

Im Wildtyp 8/1 codieren sechs der zehn am stärksten in den Infektionskissen hochregulierten Gene hypothetische Proteine. Davon sind zwei Proteine sekretiert und eines zeigt zudem Eigenschaften eines PE. Außerdem werden ein sekretiertes antifungales Protein und drei CAZy von den restlichen vier Genen codiert.

Bei den CAZy handelt es sich um eine sekretierte Xylanase, eine sekretierte Endoglucanase IV und eine Xylanase aus dem Sekundärmetabolit-Cluster C36 (Funktion unbekannt) (Abb. 15).

In der Top 10 der Δ Gpmk1 sind drei Gene, die hypothetische Proteine codieren. Von diesen weist ein sekretiertes Protein Charakteristika eines PE auf. Die restlichen sieben Gene codieren für CAZy. Bei diesen Enzymen handelt es sich um eine nicht-sekretierte Xylanase aus dem Sekundärmetabolit-Cluster C36, vier sekretierte Xylanasen, eine sekretierte Deacetylase aus dem Cluster C37 (Funktion unbekannt) und eine sekretierte Cellobiosidase (Abb. 15). Eines der hypothetischen Proteine (FGSG_17054) mit der im Vergleich zum Myzel höchsten Expression in den Δ Gpmk1 Infektionskissen wird auch in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 am stärksten exprimiert. Auch drei weitere Gene (FGSG_06445, FGSG_10999, FGSG_12456) sind in den Infektionskissen beider Stämme hochreguliert (Abb. 15).

3.3.2.4 Regulation der Gene und die Funktion der codierten Proteine von *F. graminearum* Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1

3.3.2.4.1 Funktionsbezogene Transkriptionsmuster der Gene von Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 in individueller Betrachtung

Die transkriptionelle Verteilung der Gene von *F. graminearum* wurde auf Grundlage der funktionalen Eigenschaften der von den Genen codierten Proteine untersucht. Nach der Betrachtung der pflanzen-regulierten Gene, wurde die davon unabhängige differentielle Genexpression in den zwei bei der Infektion der Wirtspflanze gebildeten Zelltypen, den Laufhyphen und Infektionskissen, analysiert. Der Wildtyp 8/1 und die Δ Gpmk1 wurden dabei vorerst getrennt behandelt (Abb. 16, Abb. 17).

Im Wildtyp 8/1 sind insgesamt 640 Gene differentiell in Laufhyphen und Infektionskissen reguliert und vergleichsbedingt unterscheidet sich das Expressionsmuster der Zelltypen stark voneinander. Allerdings fällt auf, dass die am stärksten hochregulierten Gene in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 deutlich stärker exprimiert sind als die höchsten in den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 und auch, dass die Anzahl hochregulierter Gene in den Infektionskissen deutlich höher ist (RH up: 147 Gene, IC up: 493 Gene) (Abb. 16).

Unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen sind in den Infektionskissen fünf hypothetische Proteine, von denen vier sekretiert und PE sind. Von den übrigen fünf Genen werden eine sekretierte Acetylxytan-Esterase, eine sekretierte Chloroperoxidase, ein RAY38 („Ribosomal-associated protein of yeast“) verwandtes Protein und zwei Proteine des Sekundärmetabolit-Clusters C23 codiert. Dieser Cluster ist Teil der Trichothecen-Biosynthese und die von den Genen codierten Proteine sind eine Trichodien-Oxygenase (FGSG_03535, TRI4) und ein funktional nicht definiertes Protein des Syntheseweges (FGSG_03543, TRI14) (Abb. 16).

Von den Top 10 der in den Laufhyphen hochregulierten Gene codieren vier für hypothetische Proteine, von denen eines sekretiert wird. Auch werden fünf Proteine, die Teil des Sekundärmetabolit-Clusters der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Biosynthese C13 sind, stark exprimiert: Eine O-Methyltransferase, eine sekretierte Laccase, ein Teil einer Pigment-Polyketid-Synthase, ein sekretiertes Fasciclin-Domänen-Protein und eine sekretierte Flavin-abhängige Monooxygenase. Neben diesen Cluster-Proteinen wird eine Amin-Oxidase durch ein weiteres hochreguliertes Gen codiert (Abb. 16).

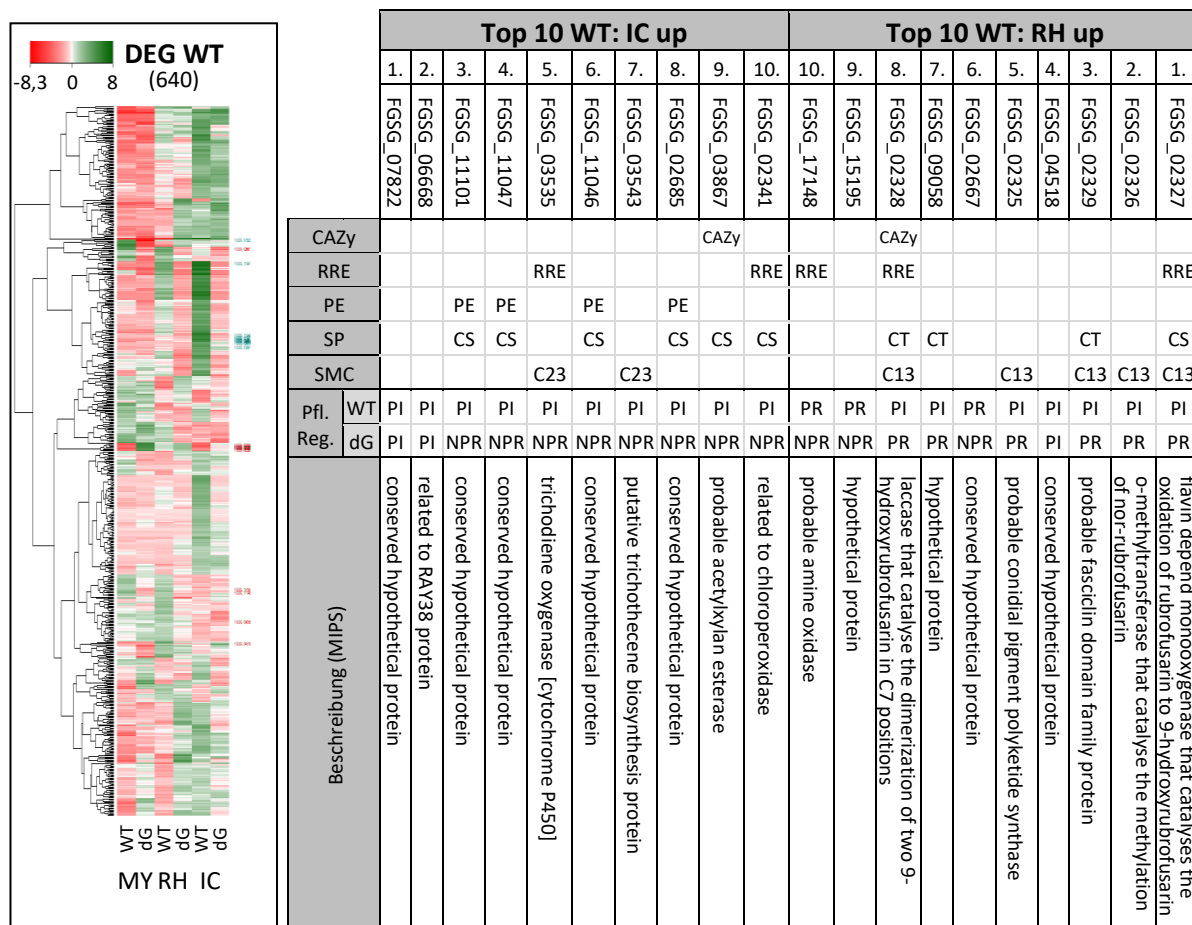


Abb. 16: Transkriptionsmuster differentiell exprimierter Gene in Infektionskissen und Laufhyphen des Wildtyps 8/1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der differentiell exprimierten Gene (DEG) in Infektionskissen (IC) und Laufhyphen (RH) des Wildtyps 8/1 (WT) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn am stärksten hochregulierten Gene in Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 sind neben der Heatmap jeweils für die Infektionskissen in Cyan und die Laufhyphen in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

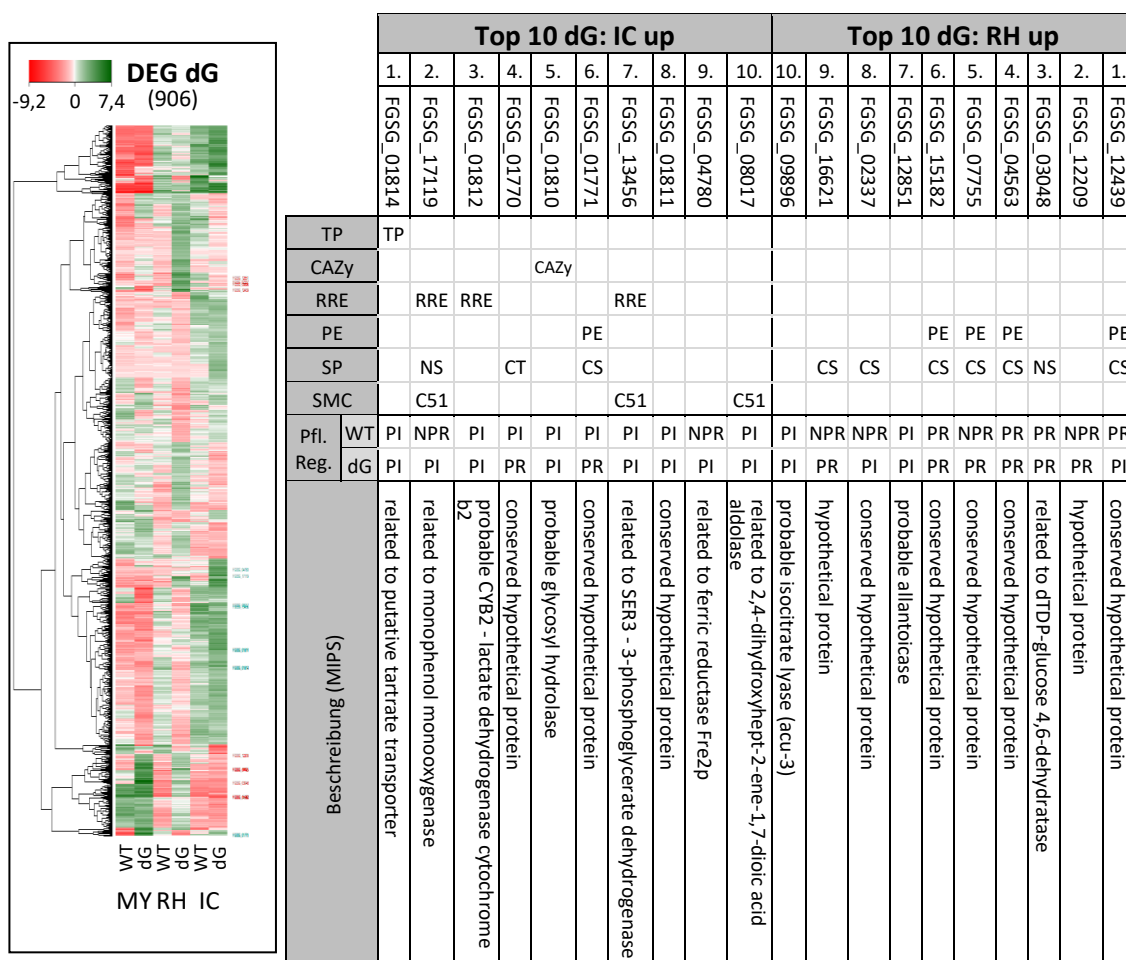


Abb. 17: Transkriptionsmuster differenziell exprimierter Gene in Infektionskissen und Laufhyphen der $\Delta Gpmk1$. Die Heatmap zeigt die Verteilung der differenziell exprimierten Gene (DEG) in Infektionskissen (IC) und Laufhyphen (RH) der $\Delta Gpmk1$ (dG) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 (WT) und der $\Delta Gpmk1$. Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn am stärksten hochregulierten Gene in Laufhyphen und Infektionskissen der $\Delta Gpmk1$ sind neben der Heatmap jeweils für die Infektionskissen in Cyan und die Laufhyphen in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, TP: Transporterproteine, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembranomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

In der $\Delta Gpmk1$ sind insgesamt 906 Gene differenziell in den Laufhyphen und den Infektionskissen exprimiert. Auch hier ist das Muster der Expression definitionsgemäß in den beiden Zelltypen sehr unterschiedlich. Die Anzahl der hochregulierten Gene ist in den Infektionskissen höher als in den Laufhyphen (RH up: 374, IC up: 532) (Abb. 17).

Unter den zehn am stärksten in den Infektionskissen der $\Delta Gpmk1$ hochregulierten Genen sind drei Gene, die hypothetische Proteine codieren. Zwei davon sind sekretiert und eines besitzt zusätzlich Eigenschaften eines PE. Von weiteren hochregulierten Genen werden eine Glycosylhydrolase, ein Tartrat-Transporter, eine Eisen(III)-Reduktase und eine Oxidoreduktase (CYB2) codiert. Zudem sind drei Gene in den Infektionskissen hochreguliert, die Proteine aus dem Sekundärmetabolit-Cluster C51 (Funktion unbekannt) codieren.

Dabei handelt es sich um eine Oxidoreduktase mit Verwandtschaft zum Proteine SER3 eine Aldolase und eine sekretierte Monophenol-Monooxygenase (Abb. 17).

In den Laufhyphen der Δ Gpmk1 sind unter den zehn am höchsten regulierten Genen sieben Gene, die hypothetische Proteine codieren. Davon sind sechs sekretiert und vier weisen zusätzlich Charakteristika eines PE auf. Die übrigen drei Gene codieren für eine sekretierte dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase, eine Allantoicase und eine Isocitrat-Lyase (acu-3) (Abb. 17).

3.3.2.4.2 Vergleichende Analyse der Genregulation in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1

Um die durch die Deletion der Gpmk1 (FGSG_06385) entstandenen Unterschiede in der Regulation der Gene von *F. graminearum* zu erkennen, wurden die Transkriptomprofile der drei Zelltypen Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 einem direkten Vergleich unterzogen.

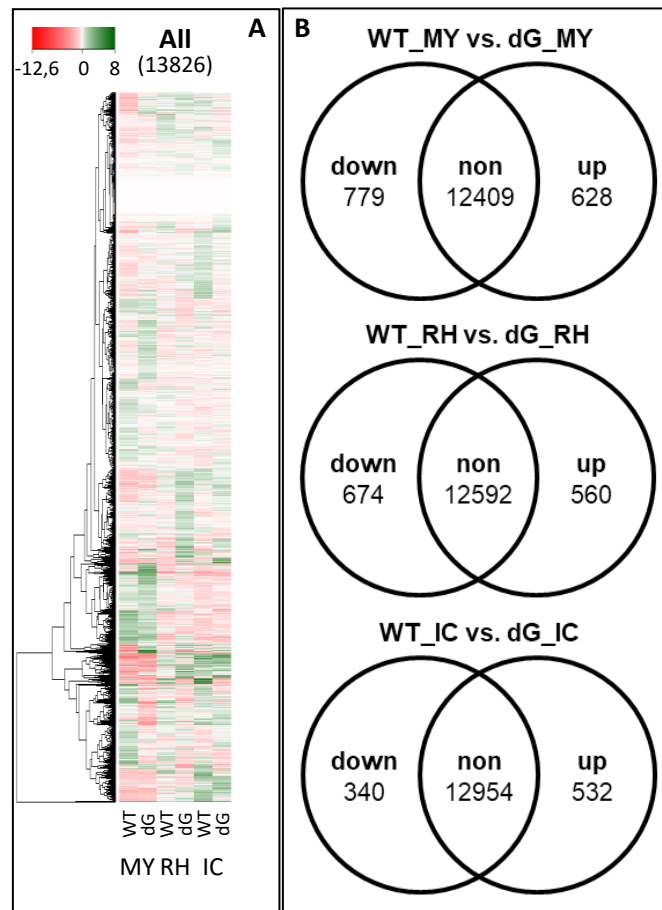


Abb. 18: Transkriptionsmuster des Genoms von Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. A: Heatmap der Verteilung aller Gene von *F. graminearum* (all) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. B: Vergleich der Transkription aller Gene in dem Myzel, den Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1. non: nicht regulierte Gene, down: herunterregulierte Gene, up: hochregulierte Gene. Die Regulation bezieht sich stets auf den erstgenannten Vergleichspartner.

Das generelle Transkriptionsmuster der gesamten 13826 Gene zeigt, dass in jedem Zelltyp unabhängig vom Stamm Gene hochreguliert bzw. herunterreguliert sind. Das anteilige Verhältnis ist dabei in allen Zelltypen tendenziell gleich. Bei einer überblickenden Betrachtung sind keine großen Bereiche mit einer extremen differentiellen Expression zu erkennen, sondern nur vereinzelte kleine Gruppen von Genen (Abb. 18A).

Im Vergleich vom Myzel des Wildtyps 8/1 und dem der Δ Gpmk1 sind 12409 Gene (89,8 %) nicht differentiell reguliert, 779 Gene (5,6 %) im Myzel der Δ Gpmk1 hochreguliert und 628 Gene (4,5 %) im Myzel des Wildtyps 8/1. Insgesamt sind also 1407 Gene im Myzel der beiden Stämme unterschiedlich transkribiert (Abb. 18B).

In den Laufhyphen sind 12592 Gene (91 %) in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 im gleichen Maße exprimiert. In den Laufhyphen der Δ Gpmk1 sind 674 Gene (4,9 %) hochreguliert und in denen des Wildtyps 8/1 560 Gene (4,1 %). Zusammen zählen also 1234 Gene (9 %) in den Laufhyphen zu den differentiell regulierten Genen (Abb. 18B).

Wird die Transkription der Gene in den Infektionskissen der beiden Stämme miteinander verglichen, zeigt sich, dass 12954 Gene (93,7 %) nicht unterschiedlich reguliert werden. Hingegen sind 340 Gene (2,5 %) in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 hochreguliert und 532 Gene (3,9 %) in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1. Es werden also 872 Gene (6,3 %) in den Infektionsstrukturen der beiden Stämme unterschiedlich reguliert (Abb. 18B).

3.3.2.4.3 Funktionsbezogene Transkriptionsmuster der Gene von Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 in komparativer Betrachtung

Die Betrachtung des transkriptionellen Expressionsmusters der Gene von *F. graminearum* wurde in Bezug auf die funktionale Charakterisierung der von den Genen codierten Proteine durchgeführt. Dabei werden das Myzel, die Laufhyphen und die Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 für die folgende Analyse in den direkten Vergleich gesetzt.

Bei der überblickenden Untersuchung der Genexpression im Myzel beider Stämme zeigt sich, dass die differentiell regulierten Gene insgesamt 1474 Proteine (10 %) codieren. Davon sind 1175 Proteine (80 %) nicht-sekretiert und 299 Proteine (20 %) sekretiert. Anteilig an den differentiell regulierten Genen lassen sich die meisten nicht-sekretierten Proteine den Gruppen RRE (130 Gene, 11 %), TP (125 Gene, 11 %), TF (64 Gene, 5 %) oder Proteine ohne eine annotierte Funktion (746 Gene, 63 %) zuordnen. Unter den sekretierten Proteinen sind hauptsächlich PE (79 Gene, 26 %), CAZy (57 Gene, 19 %), RRE (36 Gene, 12 %) oder Proteine ohne eine bekannte Funktion (124 Gene, 41 %) (Tab. 12). Wird der relative Anteil der differentiell regulierten Gene in den jeweiligen funktionalen Kategorien betrachtet, sind die DH (19 %), TP (18 %) und RRE (12 %) die Kategorien mit der stärksten differentiellen Expression in den nicht-sekretierten Proteinen. In den sekretierten Proteinen werden die PE (15 %), CAZy (11 %) und RRE (3 %) am stärksten reguliert (Tab. 12).

Tab. 12: Funktionale Aufstellung differentiell regulierter Gene im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1. Die farbcodierten Heatmaps basieren auf der Anzahl der Gene pro Funktion innerhalb eines Abschnitts; Skalierung von Grün (höchster Wert) zu Rot (niedrigster Wert). Da Gene Proteine mit mehreren Funktionen codieren können, ist deren Anzahl (14092) höher als die Anzahl der Gene im Genom (13826). Die Summe der differentiell regulierten Gene (DEG) ist absolut und im prozentualen Anteil der DEG relativ zur Gesamtmenge der Gene in der betreffenden Funktionskategorie. Non SP: nicht-sekretierte Proteine, SP: sekretierte Proteine, TF: Transkriptionsfaktoren, TP: Transporterproteine, HM: Histon-modifizierende Proteine, DH: Dehydrogenasen, PK: Proteinkinasen/-phosphatasen, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, PE: putative Effektorproteine, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, GPCR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, no: Gene ohne Annotation, WT: Wildtyp 8/1, dG: Δ Gpmk1, MY: Myzel, RH: Laufhyphen, IC: Infektionskissen, non: nicht regulierte Gene, down: herunterregulierte Gene, up: hochregulierte Gene. Die Regulation bezieht sich stets auf den erstgenannten Vergleichspartner.

	Regulation	non SP											SP											non SP	SP	Σ
		TF	TP	HM	PK	DH	CAZy	PE	RRE	GPCR	no	TF	TP	HM	PK	DH	CAZy	PE	RRE	GPCR	no	Σ	Σ			
WT_MY vs. dG_MY	non	821	552	93	195	193	196	0	768	117	8272	6	2	1	3	9	231	445	139	0	575	11207	1411	12618		
	down	27	64	7	6	31	15	0	87	5	423	1	0	0	0	1	21	45	17	0	63	665	148	813		
	up	37	61	3	5	16	14	0	43	8	323	0	0	0	0	1	36	34	19	0	61	510	151	661		
	Σ DEG	64	125	10	11	47	29	0	130	13	746	1	0	0	0	2	57	79	36	0	124	1175	299	1474		
	Σ DEG [%]	7	18	10	5	19	6	0	12	10	8	0	0	0	0	1	11	15	3	0	1	9%	17%	10%		
WT_RH vs. dG_RH	non	846	562	93	199	213	199	0	799	111	8419	6	2	0	3	9	220	435	143	0	570	11441	1388	12829		
	down	26	67	7	3	11	12	0	60	6	339	0	0	1	0	0	23	48	15	0	67	531	154	685		
	up	13	48	3	4	16	14	0	39	13	260	1	0	0	0	2	45	41	17	0	62	410	168	578		
	Σ DEG	39	115	10	7	27	26	0	99	19	599	1	0	1	0	2	68	89	32	0	129	941	322	1263		
	Σ DEG [%]	4	17	10	3	11	5	0	9	15	6	0	0	1	0	1	13	17	3	0	1	8%	19%	9%		
WT_IC vs. dG_IC	non	869	608	99	202	218	202	0	829	105	8660	6	2	1	3	9	215	425	141	0	601	11792	1403	13195		
	down	8	39	2	0	6	15	0	30	5	111	0	0	0	0	0	31	46	15	0	46	216	138	354		
	up	8	30	2	4	16	8	0	39	20	247	1	0	0	0	2	42	53	19	0	52	374	169	543		
	Σ DEG	16	69	4	4	22	23	0	69	25	358	1	0	0	0	2	73	99	34	0	98	590	307	897		
	Σ DEG [%]	2	10	4	2	9	4	0	6	19	4	0	0	0	0	1	14	19	3	0	1	5%	18%	6%		

Die nähere Betrachtung des Transkriptionsmusters der im Myzel des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 differentiell exprimierten Gene zeigt sich, dass sich die generelle Expression der Proben von Myzel und Laufhyphen tendenziell stärker gleichen, als die in Myzel und Infektionskissen (Abb. 19).

Im Myzel des Wildtyps 8/1 sind unter den zehn im Vergleich zur Δ Gpmk1 am stärksten hochregulierten Genen fünf, die hypothetische Proteine codieren. Davon ist eines sekretiert und besitzt Eigenschaften eines PE. Weitere stark exprimierte Proteine sind ein Zink-Transporter des Sekundärmetabolit-Clusters C11 (Funktion unbekannt), eine sekretierte putative Effektor-Endopeptidase K, eine Linolat-Diol-Synthase sowie ein Dopamin-empfindliches Protein und das sekretierte Protein Asp FII (Abb. 19).

Gegenüber dem Wildtyp 8/1 sind im Myzel der Δ Gpmk1 unter den zehn am höchsten transkribierten Genen vier, welche hypothetische Proteine codierenden. Von diesen sind drei sekretiert und zwei zeigen zudem Charakteristika eines PE. Fünf weitere hochregulierte Gene codieren für Proteine des Sekundärmetabolit-Clusters der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Biosynthese C13. Bei diesen Proteinen handelt es sich um eine sekretierte Laccase, eine sekretierte Monooxygenase, eine Polyketid-Synthase (FgPKS12), einen Teil einer Pigment-Polyketid-Synthase und eine O-Methyltransferase.

Neben den genannten Cluster-Genen ist das Gen für das Major-Facilitator-Protein MirA in der Δ Gpmk1 hochreguliert (Abb. 19).

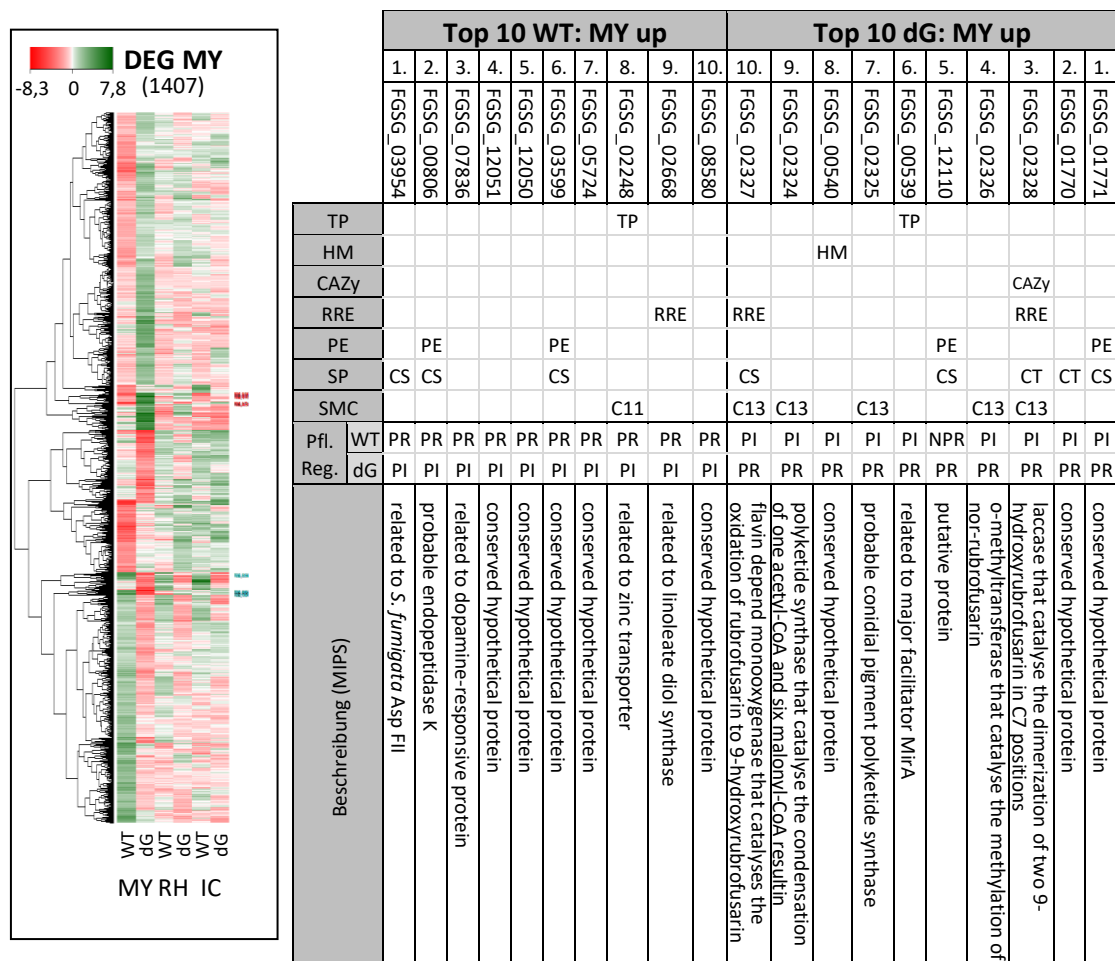


Abb. 19: Transkriptionsmuster differentiell im Myzel des Wildtyps 8/1 und der Δ Gmpk1 exprimierter Gene.

Die Heatmap zeigt die Verteilung der differentiell im Myzel (MY) exprimierten Gene (DEG) in den drei Zelltypen Myzel, Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich des Myzels am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, TP: Transporterproteine, HM: Histon-modifizierende Proteine, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Die differentiell regulierten Gene in den Laufhyphen der beiden Stämme codieren insgesamt 1263 Proteine (9 %). Von diesen sind 941 nicht-sekretierte Proteine (75 %) und 322 sekretierte Proteine (25 %). Relativ zur Gesamtzahl der differentiell regulierten Gene unter den nicht-sekretierten Proteinen besitzen die meisten eine Funktion als TP (115 Gene, 12 %), RRE (99 Gene, 11 %) oder TF (29 Gene, 4 %). 599 Gene (64 %) codieren Proteine, die keiner bekannten Funktion zuzuordnen sind. Von den sekretierten Proteinen sind der größte Teil PE (89 Gene, 28 %), CAZy (68 Gene, 21 %), RRE (32 Gene, 10 %) oder Proteine ohne eine Annotation (129 Gene, 40 %) (Tab. 12).

Der Anteil differentiell regulierter Gene in den jeweiligen Funktionskategorien war bei den nicht-sekretierten Proteinen innerhalb der TP (17 %), GPCR (15 %) und DH (11 %) und bei den sekretierten Proteinen in den PE (17 %), CAZy (13 %) und RRE (3 %) am größten (Tab. 12).

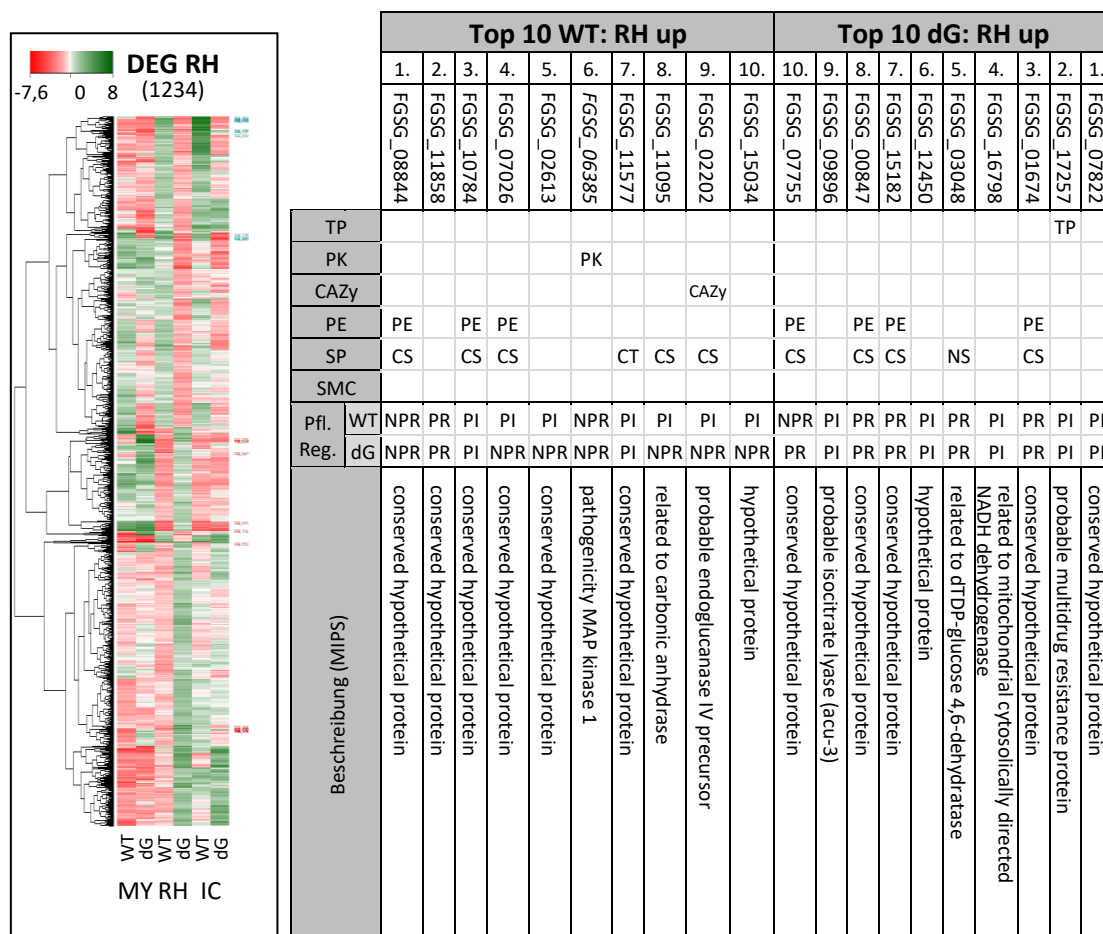


Abb. 20: Transkriptionsmuster differentiell in den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 exprimierter Gene. Die Heatmap zeigt die Verteilung der differentiell in den Laufhyphen (RH) exprimierten Gene (DEG) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Laufhyphen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, TP: Transporterproteine, PK: Proteinkinasen/- phosphatasen, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Das Verteilungsmuster der in den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 differentiell regulierten Gene zeigt eine klare Differenzierung zwischen den beiden Stämmen und zeichnet sich tendenziell auch im Transkriptionsmuster der Infektionskissen ab (Abb. 20).

Durch die zehn im Vergleich zur Δ Gpmk1 am stärksten exprimierten Gene im Wildtyp 8/1 werden unter anderem sieben hypothetische Proteine codiert.

Von diesen werden vier sekretiert und drei können zudem als PE definiert werden. Die restlichen drei Gene codieren eine sekretierte Endoglucanase IV, eine sekretierte Carbonanhydratase und, bedingt durch die Modifikation des Genoms der Vergleichsmutante, die Gpmk1 (Abb. 20).

In den Laufhyphen der Δ Gpmk1 sind unter den zehn vergleichsweise am höchsten regulierten Genen sechs, die hypothetische Proteine codieren. Vier dieser Proteine werden sekretiert und haben die Eigenschaften von PE. Darüber hinaus werden ein Multidrug-Resistance-Related Protein (MRP), eine NADH-Dehydrogenase, eine sekretierte dTDP-Glucose 4,6-Dehydratase und eine Isocitrat-Lyase (acu-3) codiert (Abb. 20).

Durch den Vergleich der Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 konnten 897 durch differentiell regulierte Gene codierte Proteine (6 %) identifiziert werden. Davon werden insgesamt 590 Proteine (66 %) nicht-sekretiert und 307 Proteine (34 %) sekretiert. Von diesen differentiell regulierten nicht-sekretierten Proteinen fungieren die meisten hauptsächlich als TP (69 Gene, 12 %), RRE (69 Gene, 12 %), GPCR (25 Gene, 4 %) oder haben keine bisher benannte Funktion (358 Gene, 61 %). Die sekretierten Proteine mit einer differentiellen Expression sind größtenteils PE (99 Gene, 32 %), CAZy (73 Gene, 24 %), RRE (34 Gene, 11 %) oder sind nicht annotiert (98 Gene, 32 %) (Tab. 12). In Relation zur Gesamtzahl der Gene, die Proteine einer Funktion codieren, ist der Anteil der differentiellen Expression bei den nicht-sekretierten Proteinen innerhalb der GPCR (19 %), TP (10 %) und DH (9 %) und bei den sekretierten Proteinen in den PE (19 %), CAZy (14 %) und RRE (3 %) am höchsten (Tab. 12).

Das Transkriptionsmuster der differentiell in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 regulierten Genen lässt eine tendenziell höhere Ähnlichkeit der Genexpression zwischen Laufhyphen und Infektionskissen der Δ Gpmk1 als zwischen den Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 erkennen (Abb. 21).

Zu den zehn im Vergleich zur Δ Gpmk1 am stärksten regulierten Genen gehören im Wildtyp 8/1 fünf Gene, die hypothetische Proteine codieren. Diese werden alle sekretiert und drei Proteine zeigen zusätzlich Charakteristika von PE. Die weiteren fünf hochregulierten Gene codieren eine sekretierte Endoglucanase, ein Mannose-spezifisches Lectin, ein bisher unbenanntes Protein, ein sekretiertes gEgh16 Protein mit Transmembrandomäne und ein Zelloberflächenprotein aus dem Sekundärmetabolit-Cluster C51 (Funktion unbekannt) (Abb. 21).

In den Top 10 der in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 hochregulierten Gene, werden insgesamt fünf hypothetische Proteine codiert. Von diesen werden drei sekretiert und zwei erfüllen die Definition eines PE. Weiterhin werden durch die hochregulierten Gene auch die folgenden sekretierten Proteine codiert: eine Alpha-N-Arabinofuranoidase, ein Endothiapepsin und ein Aspergillopepsin II sowie eine Peroxidase und eine Tyrosinase des Sekundärmetabolit-Clusters C51 (Funktion unbekannt) codiert (Abb. 21).



Abb. 21: Transkriptionsmuster differenziell in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gmpk1 exprimierter Gene. Die Heatmap zeigt die Verteilung der differenziell in den Infektionskissen (IC) exprimierten Gene (DEG) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

3.3.2.4.4 Funktionsbezogene Transkriptionsmuster hochregulierter Gene in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gmpk1

Zur weiteren Untersuchung der frühen Infektion der Wirtspflanze durch *F. graminearum* und insbesondere dem unterschiedlichen Verlauf dieses Prozesses im Wildtyp 8/1 und der Δ Gmpk1 wird im Folgenden eine vergleichende Analyse der Transkription von Genen in den Infektionskissen der beiden Stämme durchgeführt.

Da die Infektionskissen durch die Deletion der Gpmk1 mehrere Eigenschaften, welche die Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion sind, vollständig verloren haben, wie unter anderem die Fähigkeit zur Penetration der Zellwand eines Blütenblatts der Weizenpflanze oder die Synthese des Mykotoxins Deoxynivalenol, werden in verschiedenen funktionalen Kategorien jeweils die zehn am stärksten hochregulierten Gene in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 näher betrachtet.

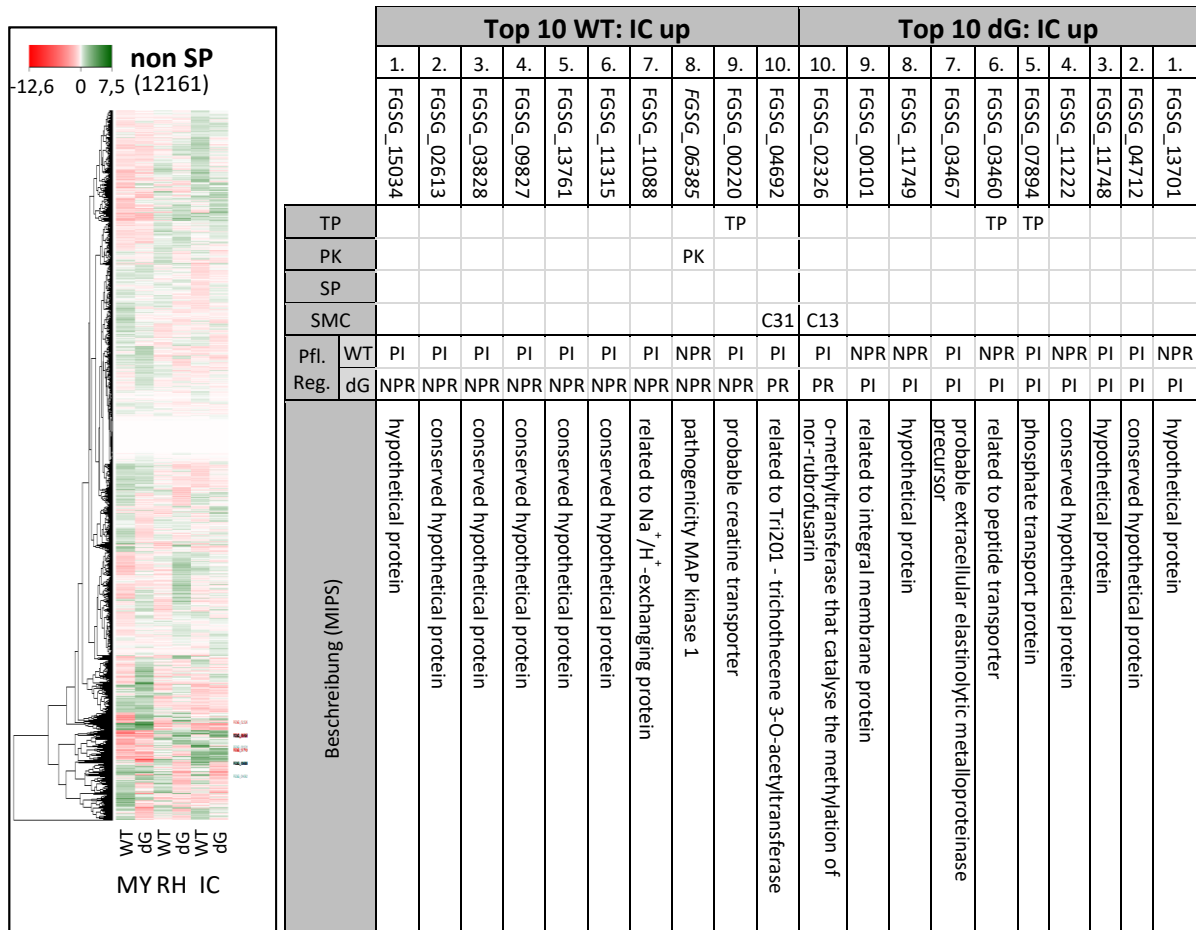


Abb. 22: Transkriptionsmuster der Gene nicht-sekretierter Proteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für nicht-sekretierte Proteine (non SP) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, TP: Transporterproteine, PK: Proteinkinasen/-phosphatasen, SP: sekretierte Proteine, SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Die funktionsübergreifende Gruppe der nicht-sekretierten Proteine umfasst 12161 codierende Gene. Das Transkriptionsmuster der nicht-sekretierten Proteine ist größtenteils unauffällig und zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Regulation über das Myzel, die Laufhyphen und die Infektionskissen (Abb. 22). Von den zehn im Vergleich zur Δ Gpmk1 am stärksten hochregulierten Genen in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 werden sechs hypothetische Proteine, ein Natriumprotonen-Austauscher, ein Kreatin-Transporter

und die Trichothecen-3-O-Acetyltransferase TRI201 des Sekundärmetabolit-Clusters C31 (Funktion unbekannt) codiert. Zusätzlich ist die Gpmk1 durch die Ausschaltung in der Mutante unter den zehn hochregulierten Proteinen im Wildtyp 8/1. Trotz ihres vollständigen Fehlens ist die Gpmk1 allerdings nur auf dem achten Rang, somit sind sieben Gene in einem höheren Maß differentiell reguliert (Abb. 22).

In den Infektionskissen der Δ Gpmk1 codieren die zehn am stärksten hochregulierten Gene insgesamt fünf hypothetische Proteine, einen Phosphat-Transporter, einen Peptid-Transporter, eine Metalloproteinase, ein integrales Membranprotein und eine O-Methyltransferase des Sekundärmetabolit-Clusters der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Biosynthese C13 (Abb. 22).

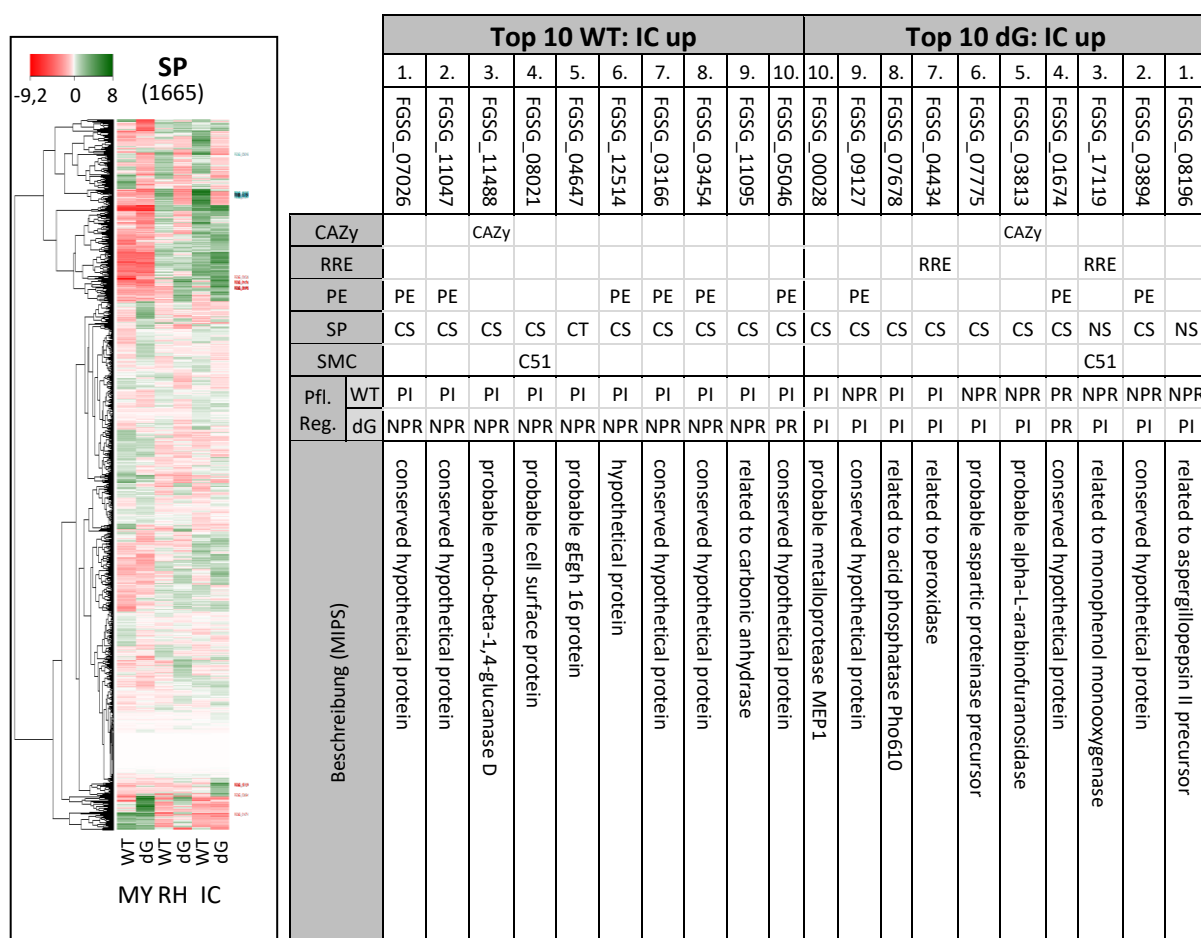


Abb. 23: Transkriptionsmuster der Gene sekretierter Proteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für sekretierte Proteine (SP) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, PE: Putative Effektorproteine, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Das Transkriptionsmuster der restlichen insgesamt 1665 sekretierten Proteine in den drei Zelltypen zeigt eine deutliche Tendenz der erhöhten Transkription einer großen Gruppe von Genen in den Infektionskissen von Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1, insbesondere im Vergleich zur Expression im Myzel der Stämme (Abb. 23).

Unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen sekretierter Proteine in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 codieren sechs Gene hypothetische Proteine, die alle Eigenschaften von PE besitzen. Die übrigen vier Gene codieren eine Endoglucanase, eine Carbonanhydratase, ein gEgh16 Protein mit Transmembrandomäne und ein Zelloberflächenprotein des Sekundärmetabolit-Clusters C51 (Funktion unbekannt) (Abb. 23). Von den zehn in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 hochregulierten Genen codieren drei hypothetische Proteine, die als PE definiert werden. Neben diesen werden eine Alpha-N-Arabinofuranosidase, ein Aspergillopepsin II, eine Aspartatprotease, eine Peroxidase und Monophenol-Monooxygenase codiert. Letztgenannte ist Teil des Sekundärmetabolit-Clusters C51 (Funktion unbekannt). Zusätzlich werden eine Phosphatase mit einer Verwandtschaft zum Protein Pho610 und eine mit dem Protein MEP1 verwandte Metalloprotease codiert (Abb. 23).

In die funktionale Kategorie der Transkriptionsfaktoren (TF) können 892 Gene gefasst werden. Das Muster ihrer Transkription zeigt eine deutlich gesteigerte Expression im Myzel des Wildtyps 8/1 sowie der Δ Gpmk1. Zudem ist im Vergleich zum Wildtyp 8/1 tendenziell eine höhere Zahl von TF in alle drei Zelltypen der Δ Gpmk1 verstärkt transkribiert (Abb. 24).

Zu den zehn am stärksten hochregulierten Genen in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 zählen acht Gene, die hypothetische Proteine codieren. Davon wird eines sekretiert. Die zwei übrigen bekannten TF sind eine mit dem Ariadne-2 Protein verwandte Ubiquitin-Protein-Ligase und TRI6 (FGSG_16251), ein positiv regulierender TF des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese C23 (Abb. 24). Von diesen zehn TF haben sieben eine Zink-Finger-Domäne, zwei eine Homöodomäne und einer eine SANT-Domäne.

Im Vergleich zu den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 sind in der Δ Gpmk1 sieben Gene hochreguliert, die hypothetische Proteine codieren. Die drei weiteren Gene codieren jeweils für TF mit einer Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen: Ein Gen codiert einen Transkriptionsregulator der 26S Proteasom-Untereinheit und ist verwandt mit dem Protein RPN4, ein weiteres Gen ein Regulator-Protein der Nitrat-Assimilation mit Verwandtschaft zu dem Protein NirA und das dritte Gen codiert den Entwicklungsregulator flbA (Abb. 24). Unter diesen zehn TF sind sieben Regulatoren mit einer Zink-Finger-Domäne, vier davon mit der Pilz-spezifischen Zn_2/Cys_6 -Domäne, ein Leucin-Zipper, einer mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv und ein Pilz-spezifischer TF.

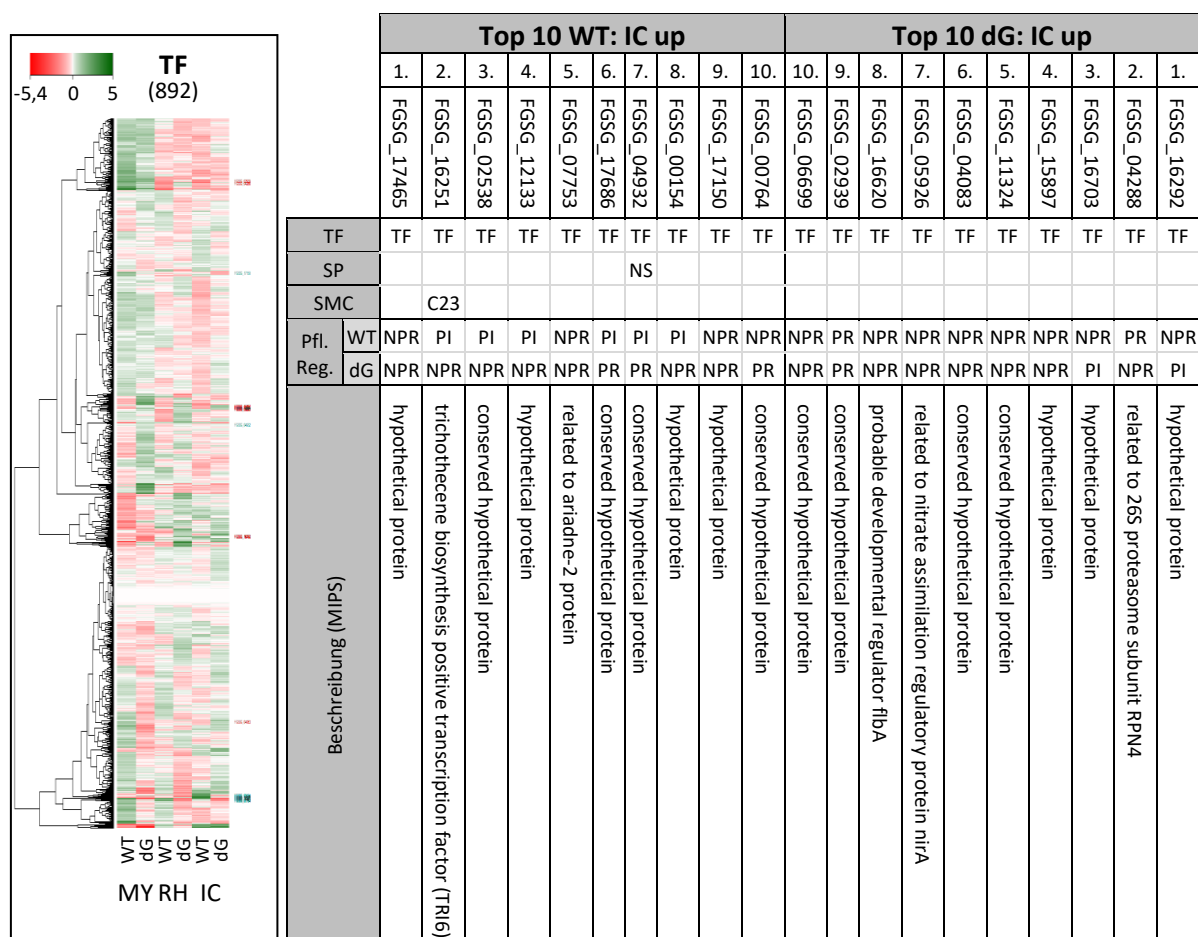


Abb. 24: Transkriptionsmuster der Gene für Transkriptionsfaktoren in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für Transkriptionsfaktoren (TF) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, SP: sekretierte Proteine (NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Das Transkriptionsmuster der 679 Gene für Transporterproteine (TP) in *F. graminearum* weist in keinem der drei betrachteten Zelltypen eine signifikante Besonderheit auf. Grundsätzlich werden sowohl im Myzel als auch auf der Pflanze in Laufhyphen und Infektionskissen Gruppen von TP mehr oder weniger stark exprimiert (Abb. 25).

In den Infektionskissen der Wildtyps 8/1 sind im Vergleich zu denen der Δ Gpmk1 die Gene der folgenden zehn ohne Ausnahme nicht-sekretierten TP hochreguliert. Die Gene codieren für eine Allantoat-Permease, eine Cholin-Permease mit Verwandtschaft zu dem Protein HNM1, einem Zink-Transporter, eine mit dem Protein Pho4 in Verbindung stehende Phosphat-Permease, drei Tartrat-Transporter und einen C₄-Dicarboxylat-Transporter mit Ähnlichkeit zu dem Protein mae1. Zudem werden zwei Hexose-Transporter codiert, von dem einer eine Verwandtschaft zu dem Protein HXT3 besitzt (Abb. 25).

Von den zehn am höchsten in den Infektionskissen der $\Delta Gpmk1$ regulierten Genen sind ausschließlich TP codiert, die nicht sekretiert werden. Es werden zwei Major-Facilitator-Proteine, ein Phosphat-Transporter, zwei Peptid-Transporter, ein Glycosid-Transporter, ein TP für Tartrat sowie eine Nicotinamid-Mononucleotid Permease codiert. Neben den Genen dieser Proteine sind die Gene für einen Pantothenat-Transporter mit Verwandtschaft zu *liz1* und für eine mit dem Protein GAP1 verwandte Aminosäure-Permease in den Infektionskissen der $\Delta Gpmk1$ hochreguliert (Abb. 25).



Abb. 25: Transkriptionsmuster der Gene für Transporterproteine in Wildtyp 8/1 und $\Delta Gpmk1$. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für Transporterproteine (TP) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der $\Delta Gpmk1$ (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die $\Delta Gpmk1$ in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, SP: sekretierte Proteine, SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Insgesamt übernehmen in *F. graminearum* 104 Proteine die Funktion eines Histon-modifizierenden Proteins (HM). Das Muster der Transkription der codierenden Gene zeigt keine Auffälligkeiten in den drei Zelltypen beider Stämme.

Auch bei den HM wird eine kleine Gruppe auf der Pflanze verstärkt transkribiert. Allerdings sind einige Gene auch im Myzel der beiden Stämme stärker exprimiert als in den Laufhyphen oder Infektionskissen (Abb. 26).

Von den zehn am stärksten in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 hochregulierten Genen werden acht hypothetische Proteine codiert. Zwei von diesen sind jeweils Teil eines Sekundärmetabolit-Clusters, den Clustern C02 und C40. Die Funktion beider Cluster ist bisher nicht bekannt. Die übrigen zwei Gene codieren eine Acetyltransferase und eine ribosomale N-Lysin-Methyltransferase (Abb. 26).

Unter den Top 10 der hochregulierten Gene in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 werden acht hypothetische Proteine codiert. Unter diesen sind zwei mit einer zusätzlichen Funktion als TF. Von den restlichen zwei Genen werden eine Histon-Lysin-N-Methyltransferase und eine Histon-Acetyltransferase codiert (Abb. 26).

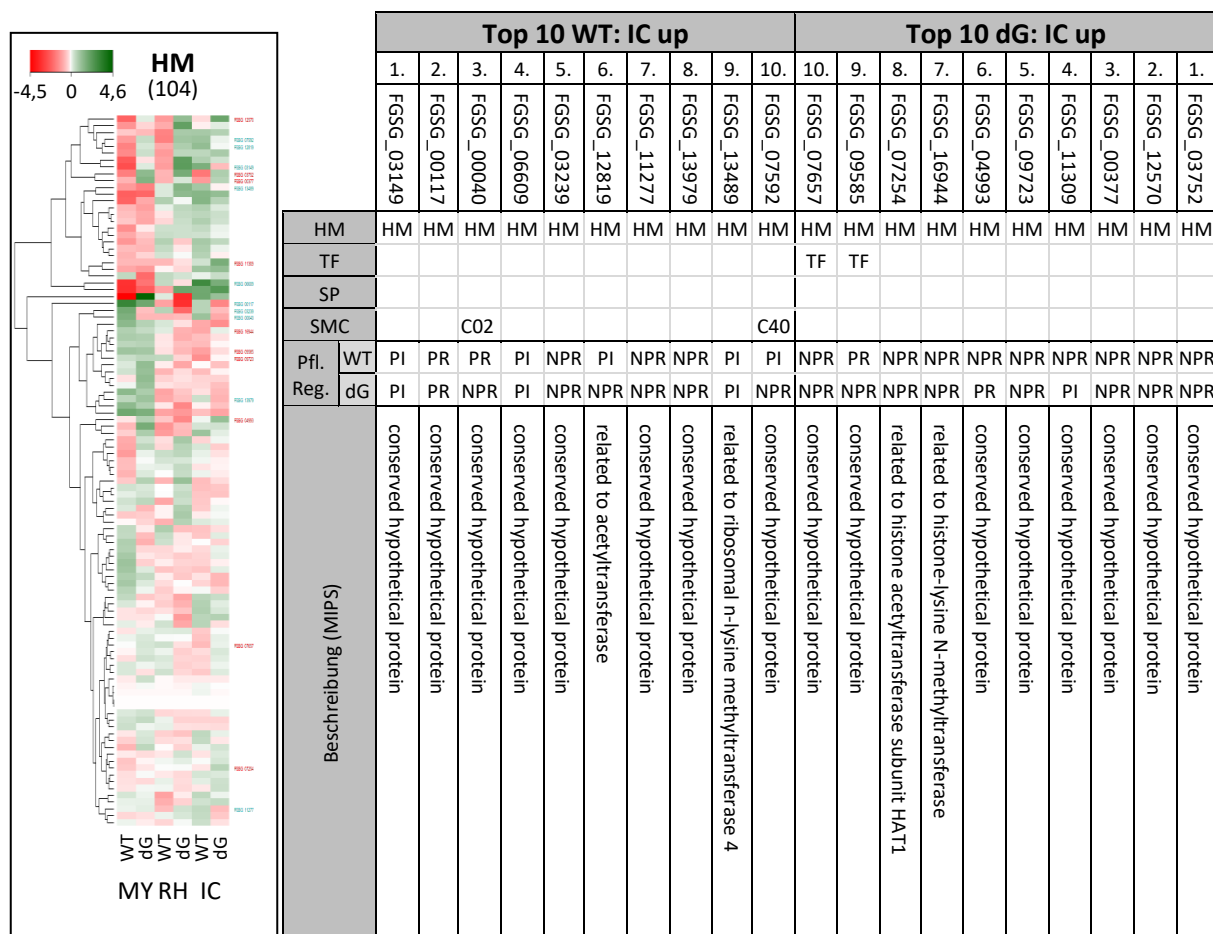


Abb. 26: Transkriptionsmuster der Gene für Histon-modifizierende Proteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für Histon-modifizierende Proteine (HM) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, TF: Transkriptionsfaktoren, SP: sekretierte Proteine, SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Die Betrachtung des Transkriptionsmusters der 209 Proteinkinasen/-phosphatasen (PK) codierenden Gene ergibt, dass ein erheblicher Anteil der PK in dem Myzel von Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 gegenüber den Laufhyphen und Infektionskissen hochreguliert sind. Zudem zeigt sich, dass PK in den Infektionskissen tendenziell unterrepräsentiert sind (Abb. 27).

In den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 sind unter den zehn am höchsten im Vergleich zur Δ Gpmk1 regulierten Genen neun hypothetische Proteine und die Gpmk1. Da diese durch die Modifikation des Genoms der Mutante ausschließlich im Wildtyp 8/1 exprimiert wird, weist die experimentbedingt die stärkste differentielle Expression auf (Abb. 27).

Zu den zehn in der Δ Gpmk1 am höchsten regulierten Genen gehören zwei, die hypothetische Proteine codieren. Weiterhin werden fünf Serin/Threonin-Proteinkinasen, eine Caseinkinase, eine Serin/Arginin-Proteinkinase und eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase codiert (Abb. 27).

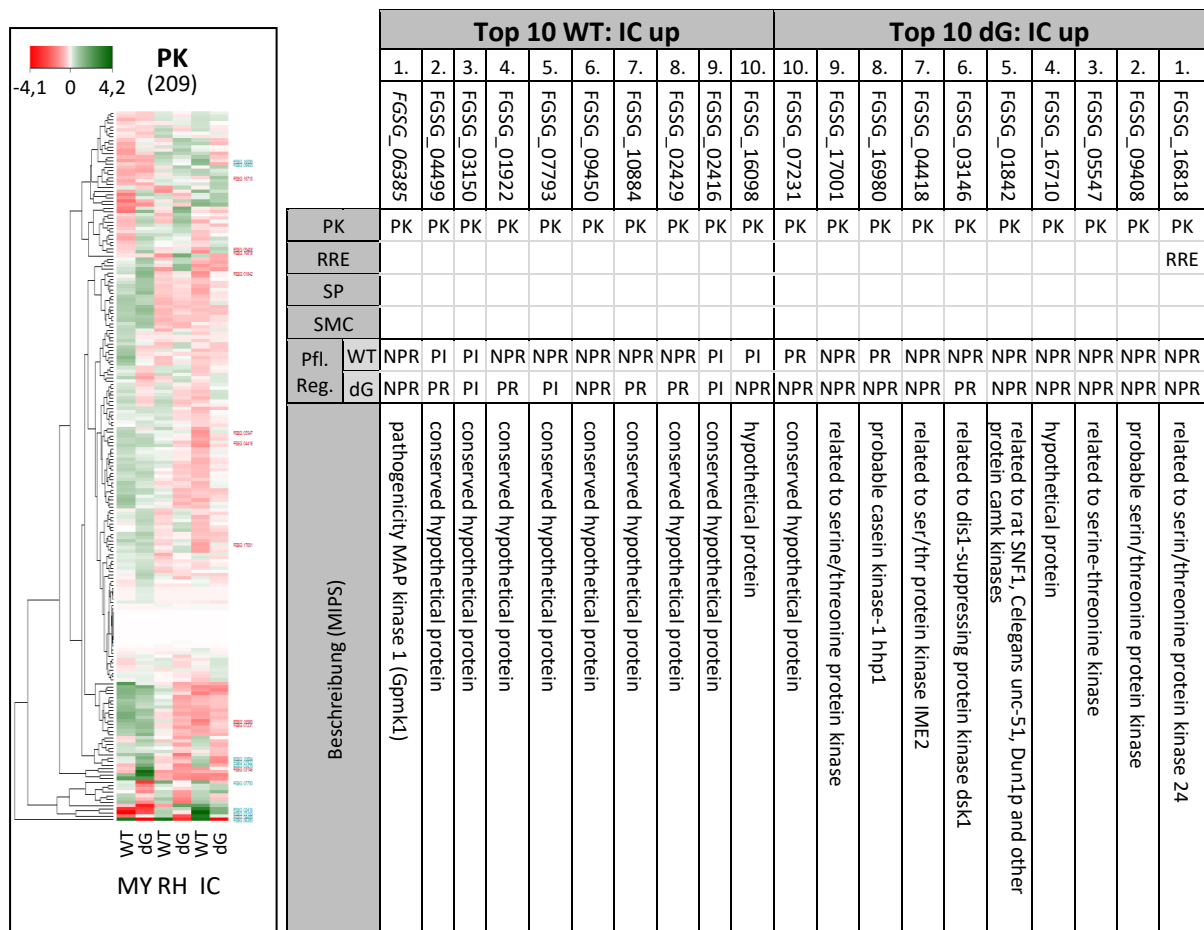


Abb. 27: Transkriptionsmuster der Gene für Proteinkinasen/-phosphatasen in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.

Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für Proteinkinasen/-phosphatasen (PK) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, SP: sekretierte Proteine, SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.



Abb. 28: Transkriptionsmuster der Gene für Dehydrogenasen in Wildtyp 8/1 und Δ Gmpk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für Dehydrogenasen (DH) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, SP: sekretierte Proteine (CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Das Transkriptionsmuster der 251 Gene, die Dehydrogenasen (DH) codieren, verdeutlicht, dass diese funktionale Gruppe in vielen Gen-Gruppen in extrem hohem bzw. niedrigem Maß exprimiert werden. Insbesondere im Myzel beider Stämme sind die DH in mehreren Bereichen stark herunterreguliert (Abb. 28).

Unter den zehn in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 am höchsten regulierten Genen ist eines, das ein hypothetisches Protein codiert.

Die restlichen neun Gene codieren für drei Dehydrogenasen kurzkettiger Alkohole, eine sekretierte lichtinduzierte Alkoholdehydrogenase aus dem Sekundärmetabolit-Cluster C16 (Funktion unbekannt), eine sekretierte Ketoreduktase, eine Aldehyddehydrogenase, eine Succinat-Semi-Aldehyddehydrogenase sowie eine D-Arabinol-2-Dehydrogenase und eine Glukose- und Ribit-Dehydrogenase des Sekundärmetabolit-Clusters C53. Dieser Cluster ist in die Synthese eines Pigments der Perithezien von *F. graminearum* involviert (Abb. 28).

In den Infektionskissen der Δ Gpmk1 codieren fünf der hochregulierten Gene hypothetische Proteine, von denen eines sekretiert wird. Die übrigen Gene codieren eine Levodion-Reduktase, eine Pektin-Depolymerase, eine Alkoholdehydrogenase II und zwei NADPH-abhängige Oxidoreduktase, von welchen eine ein Teil des Sekundärmetabolit-Clusters C51 ist (Funktion unbekannt) (Abb. 28).

Insgesamt codieren in *F. graminearum* 513 Gene kohlenhydrataktive Enzyme (CAZy). Das Transkriptionsmuster dieser Gene zeigt eine deutlich verstärkte Expression in den Laufhyphen und insbesondere den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1. Eine Gruppe von Genen weist eine äußerst starke differentielle Expression zwischen Myzel und Infektionskissen auf, diese Gene sind im Myzel stark herunter und in den Infektionskissen stark hoch reguliert. Tendenziell sind die CAZy im Vergleich der Laufhyphen beider Stämme in denen der Δ Gpmk1 weniger stark transkribiert (Abb. 29).

In den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 codieren die zehn am höchsten regulierten Gene für ein sekretiertes hypothetisches Protein, eine sekretierte Murein-Transglucosylase, eine sekretierte Pektin-Lyase, eine sekretierte Cutinase und zwei Pektat-Lyasen, von denen eine sekretiert wird. Die übrigen vier Gene codieren jeweils sekretierte Beta-1,4-Endoglucanasen. Eine Endoglucanase ist Teil des Sekundärmetabolit-Clusters C18 und somit Teil der Orcinol-Biosynthese von *F. graminearum*. Fünf dieser Gene codieren Proteine mit einer zusätzlichen Funktion als RRE. Bei diesen handelt es sich um lytische Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMO) (Abb. 29).

Unter den zehn höchstregulierten Genen in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 ist ein sekretiertes hypothetisches Protein, eine sekretierte Alpha-L-Arabinofuranosidase, eine sekretierte 6-Hydroxynicotin-Oxidase, ein sekretiertes Berberin-Brücken-Enzym, eine sekretierte Cellulase, eine sekretierte Arabinase, eine sekretierte Xylanase und eine Laccase. Ebenfalls codiert werden zwei Cellulose-1,4-Beta-Cellobiosidasen, von denen eine ein sekretiertes Protein ist (Abb. 29).

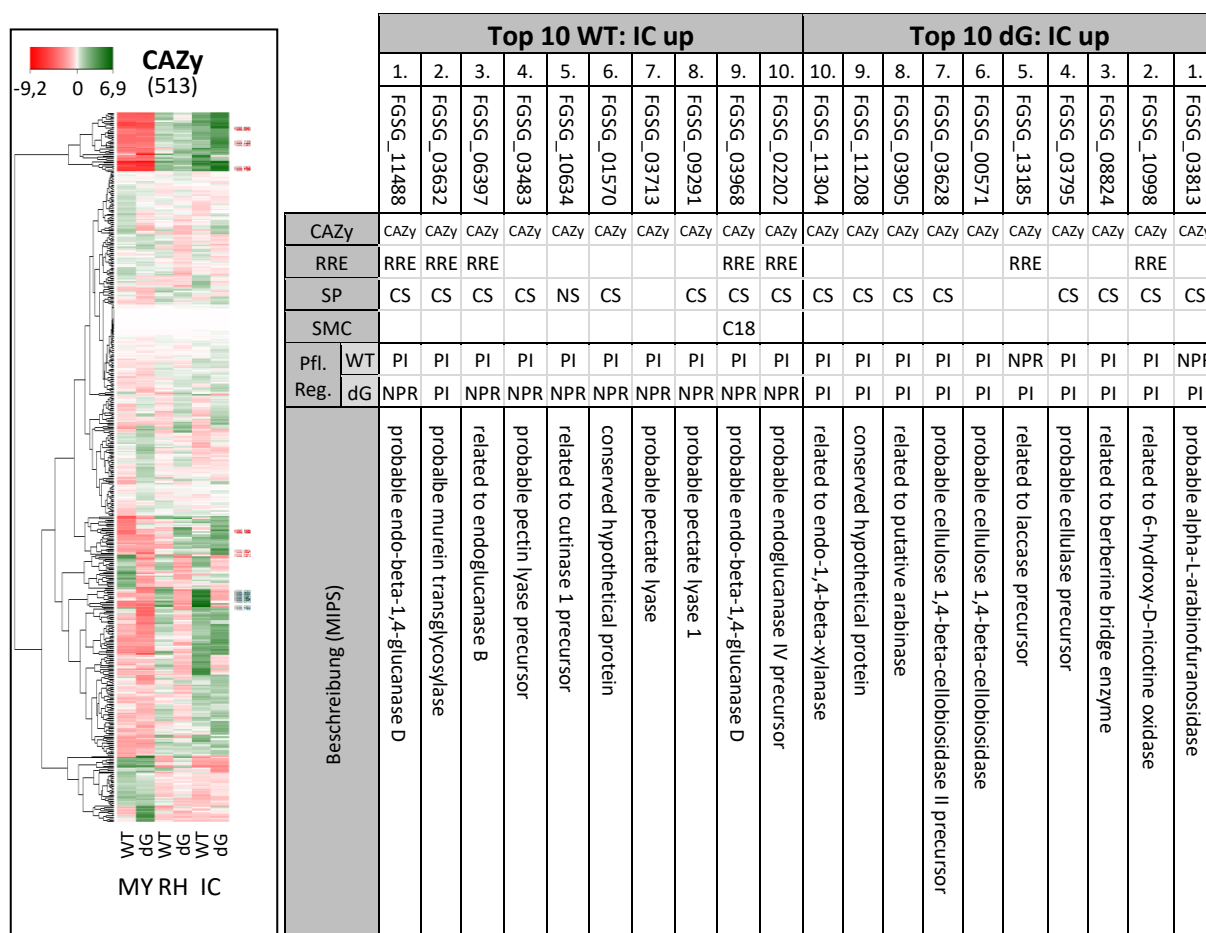


Abb. 29: Transkriptionsmuster der Gene für kohlenhydrataktive Enzyme in Wildtyp 8/1 und Δ Gmpk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für kohlenhydrataktive Enzyme (CAZy) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Für putative Effektorproteine können in *F. graminearum* 524 codierende Gene gezählt werden. Das Muster ihrer Transkription ist weitestgehend unauffällig, zeigt allerdings Gruppen von Genen, die in den Infektionskissen beider Stämme höher reguliert werden als im Myzel. Zwischen den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gmpk1 zeigen sich nur in einer kleinen Gruppe wesentliche transkriptionelle Differenzen. In diesem Bereich sind auch die zehn höchstregulierten Gene in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 zu finden. Diese Gene codieren ausschließlich sekretierte hypothetische Proteine mit typischen Eigenschaften von PE und sind bisher ohne eine bekannte Funktion (Abb. 30).

Auch die in den Infektionskissen der Δ Gmpk1 hochregulierten Gene codieren größtenteils hypothetische Proteine mit PE-Charakteristika. Nur ein codiertes Protein besitzt eine Verwandtschaft zu einer sekretierten Triacylglycerol-Lipase (Abb. 30).

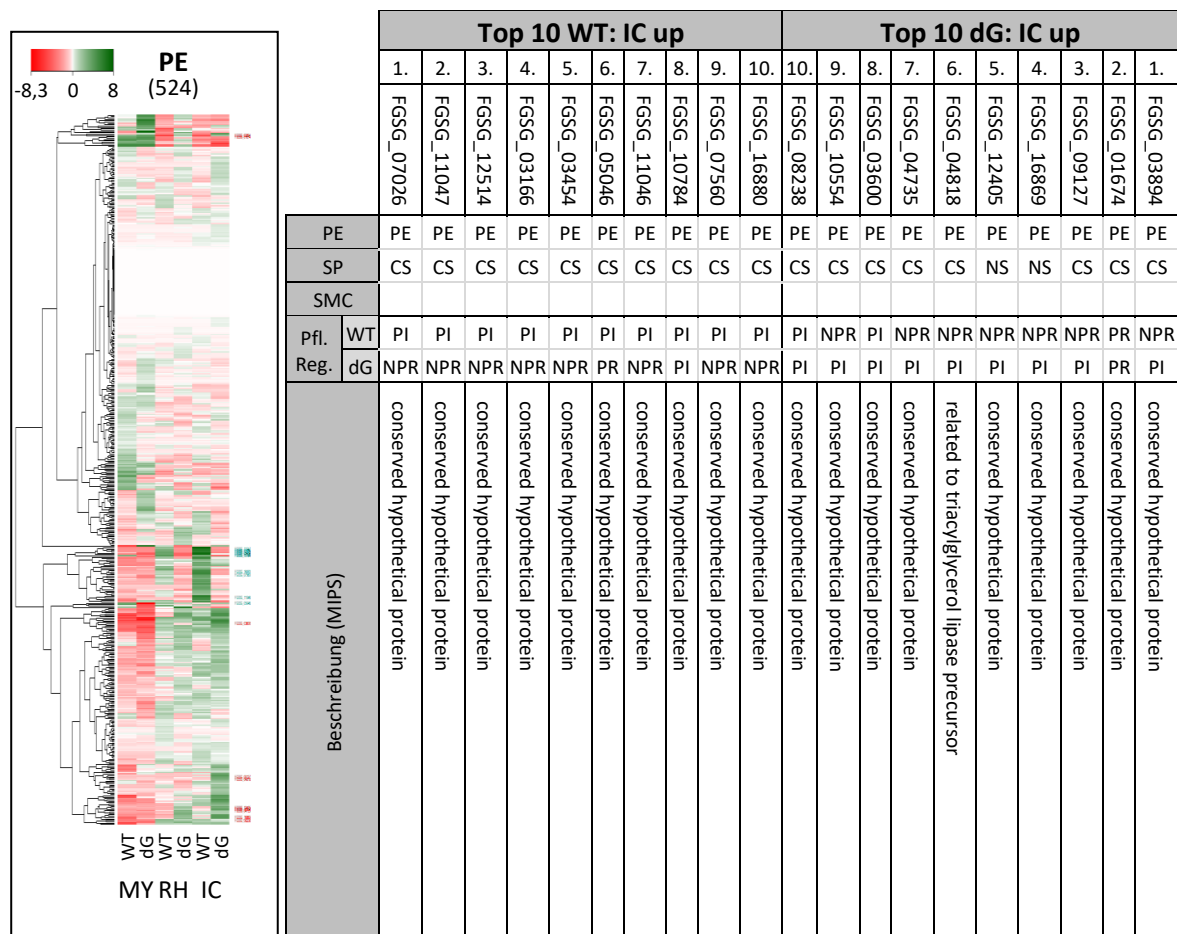


Abb. 30: Transkriptionsmuster der Gene für putative Effektorproteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gmpk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für putative Effektorproteine (PE) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Die insgesamt 1073 Gene in *F. graminearum*, die Proteine mit einer Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE) codieren, sind bei Betrachtung ihres Transkriptionsmusters tendenziell in ihrer Expressionsstärke von Myzel über die Laufhyphen in die Infektionskissen ansteigend. Somit sind die meisten RRE in den Infektionskissen beider Stämme hochreguliert und insbesondere im Myzel ist eine Gruppe von RRE stark herunterreguliert (Abb. 31).

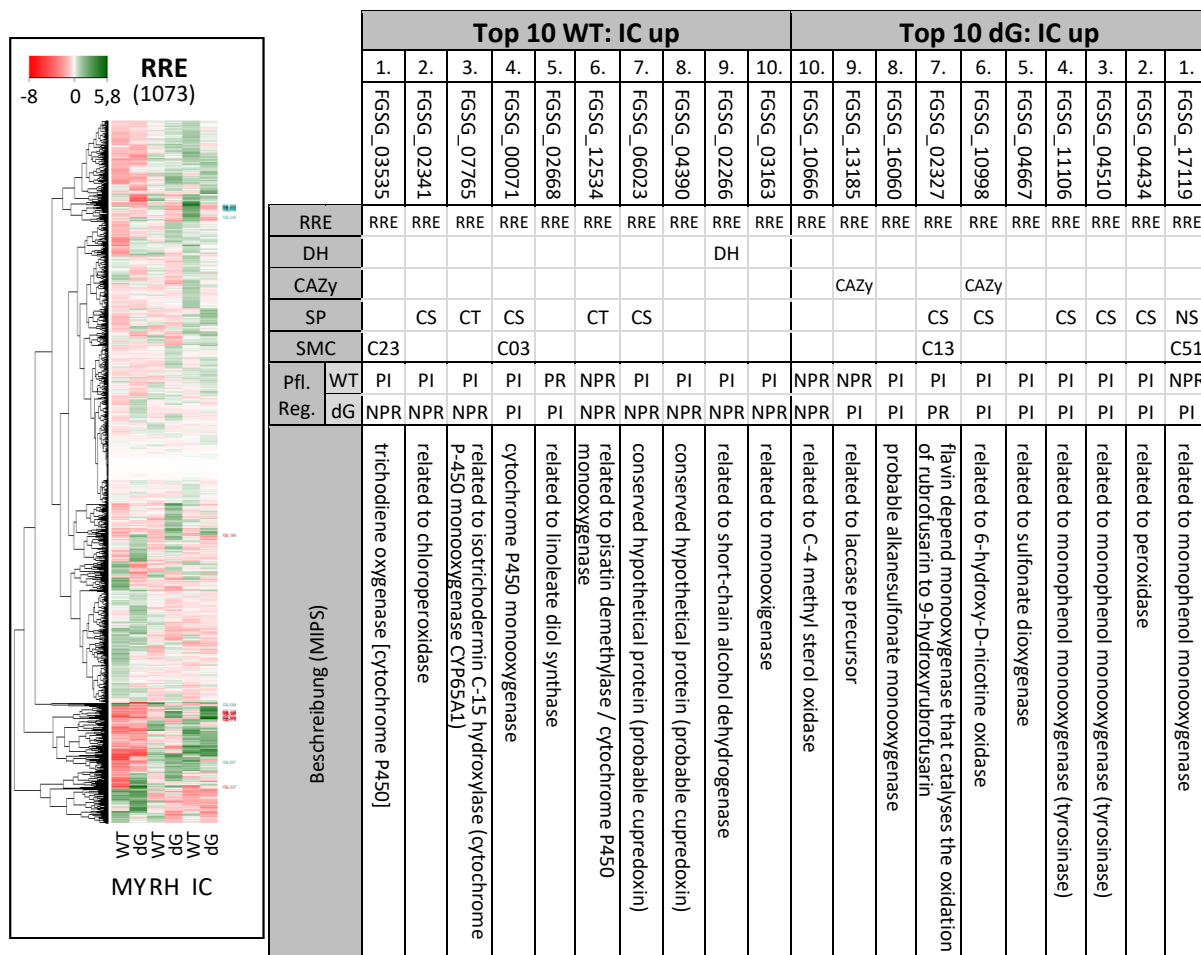


Abb. 31: Transkriptionsmuster der Gene für Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies in Wildtyp 8/1 und ΔGmpk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der ΔGmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die ΔGmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, DH: Dehydrogenasen, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion), SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

Zu den zehn am höchsten in den Wildtyp 8/1 Infektionskissen regulierten Genen zählen zwei hypothetische Proteine mit einer Cupredoxin-Domäne, von denen eines sekretiert wird. Des Weiteren werden eine Monooxygenase, drei sekretierte Cytochrom P450 Monooxygenasen, von denen eine Teil des Sekundärmetabolit-Clusters C03 ist (Funktion unbekannt), eine Dehydrogenase kurzkettiger Alkohole, eine Linolat-Diol-Synthase, eine sekretierte Chloroperoxidase und die Trichodien-Oxygenase TRI4 (FGSG_03535) des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese C23 ebenfalls verstärkt transkribiert (Abb. 31).

Unter die zehn im Vergleich zum Wildtyp 8/1 am höchsten regulierten Gene in den Infektionskissen der ΔGmpk1 fallen unter anderem fünf Gene, die Monooxygenasen codieren.

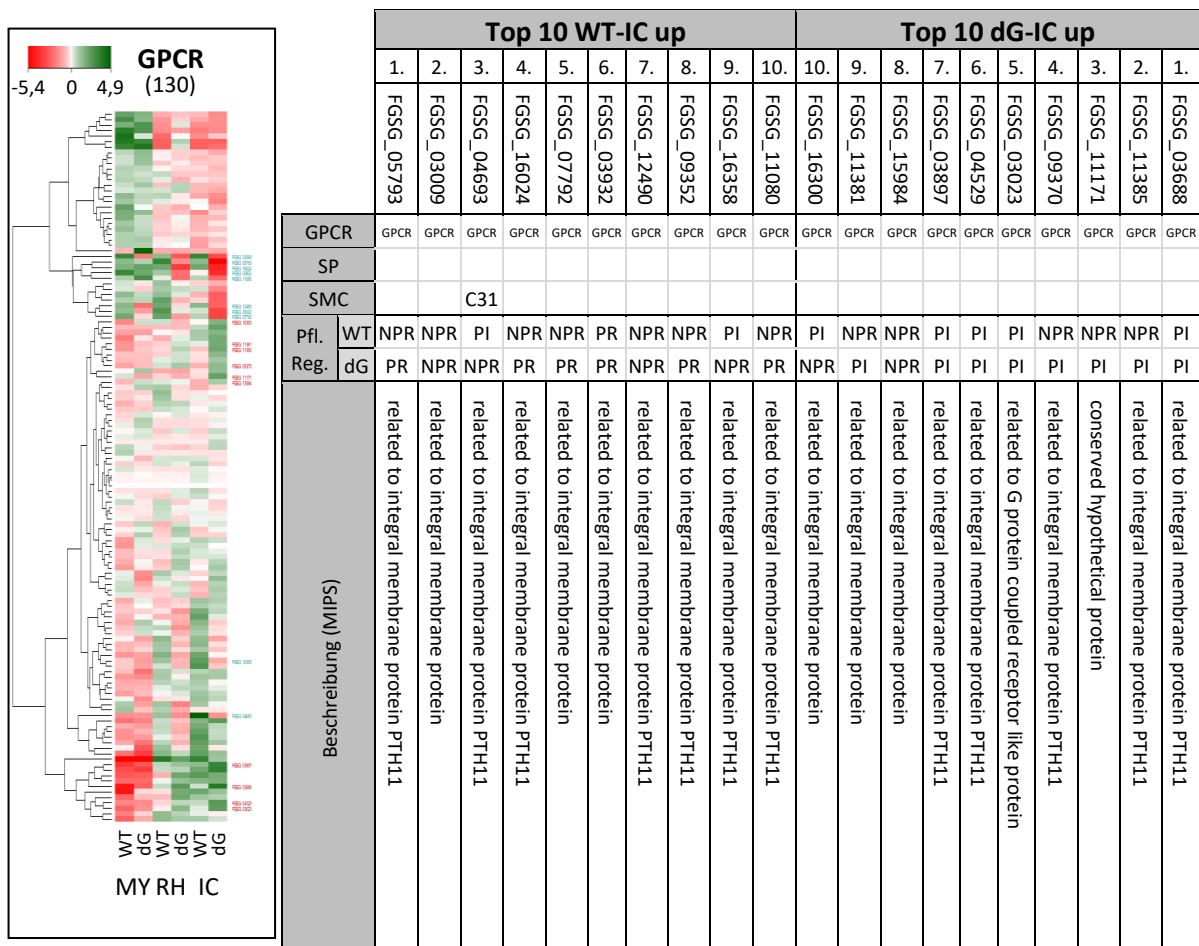


Abb. 32: Transkriptionsmuster der Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Wildtyp 8/1 und Δ Gmpk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gmpk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gmpk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, SP: sekretierte Proteine, SMC: Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten.

76

Eine kleinere Gruppe spiegelt diese Regulation und ist vergleichsweise im Myzel stark herunterreguliert. Eine weitere Gruppe von Genen ist allein in den Infektionskissen der $\Delta Gpmk1$ stark hochreguliert. Dem gegenüber steht eine Gengruppe, die ebenfalls in der $\Delta Gpmk1$ ausschließlich stark im Myzel und nicht in den auf der Wirtspflanze gebildeten Strukturen, insbesondere den Infektionskissen, transkribiert wird. Diese Gene sind in allen drei Zelltypen des Wildtyps 8/1 tendenziell gleichmäßig exprimiert. Daher sind acht der zehn Gene, die im Vergleich zur $\Delta Gpmk1$ in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 hochreguliert sind, Teil dieser Gruppe (Abb. 32).

Diese acht Gene codieren drei integrale Membranproteine sowie fünf integrale Membranproteine mit einer Verwandtschaft zu dem Protein PTH11. Die beiden übrigen Gene codieren ebenfalls für PTH11-verwandte, integrale Membranproteine. Eines von diesen ist Teil des Sekundärmetabolit-Clusters C31 (Funktion unbekannt) (Abb. 32).

Die zehn in den Infektionskissen der $\Delta Gpmk1$ hochregulierten Gene codieren für ein hypothetisches Protein, drei integrale Membranproteine, ein GPCR-ähnliches Proteine und fünf integrale Membranproteine mit einer Ähnlichkeit zu dem Protein PTH11 (Abb. 32).

Insgesamt gehören in *F. graminearum* 687 Gene einem Sekundärmetabolit-Cluster (SMC) an. Die Analyse des Transkriptionsmusters zeigt, dass viele Gene im Myzel des Wildtyps 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ tendenziell höher reguliert sind, als in den Laufhyphen oder Infektionskissen. Eine kleine Gruppe von Genen ist sogar überdurchschnittlich stark im Myzel der beiden Stämme transkribiert. Eine weitere Gruppe ist ausschließlich in den drei Zelltypen der $\Delta Gpmk1$ verstärkt exprimiert. Die zehn am stärksten in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 hochregulierten Gene sind nahezu alle Teil einer Gruppe von Genen, die nur in den Infektionskissen der Wildtyps 8/1 hochreguliert sind. Dieser Gruppe schließt sich eine kleine Anzahl von Genen an, die neben einer hohen Transkription in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 auch eine hohe Expression in denen der $\Delta Gpmk1$ ausweisen (Abb. 33).

Die zehn in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 hochregulierten Gene codieren Proteine in den folgenden sieben Sekundärmetabolit-Clustern. Von Genen aus Clustern mit einer bisher unbekannten Funktion werden eine sekretierte Cytochrom P450 Monooxygenase des Clusters C03, ein sekretiertes hypothetisches Protein aus dem Cluster C38, ein sekretiertes Zelloberflächenprotein aus dem Cluster C51, die sekretierte Protease Oryzin aus dem Cluster C56 sowie die Trichothecen-3-O-Acetyltransferase TRI201 und ein integrales Membranprotein mit einer Verwandtschaft zu dem Protein PTH11, beide jeweils Teil des Clusters C31, codiert. Gene aus Sekundärmetabolit-Clustern mit einer bekannten Funktion codieren eine sekretierte Endoglucanase aus dem Cluster der Orcinol-Biosynthese C18 und drei Proteine aus dem Trichothecen-Biosynthese-Cluster C23: die Trichodien-Synthase TRI5

(FGSG_03537), die Trichodien-Oxygenase TRI4 (FGSG_03535) und das funktional nicht definierte Protein des Syntheseweges TRI14 (FGSG_03543) (Abb. 33).

In den Infektionskissen der Δ Gpmk1 codieren fünf der zehn am stärksten hochregulierten Gene für Proteine aus Sekundärmetabolit-Clustern mit einer noch unbekannten Funktion. Diese Proteine sind ein sekretiertes Proteoglykan aus dem Cluster C01, eine Eisen(III)-Reduktase aus dem Cluster C08, eine nicht-ribosomale Peptid-Synthetase des Clusters C22, eine sekretierte Acetylhydrolase des Clusters C36 und eine sekretierte Monophenol-Monooxygenase, welche Teil des Clusters C51 ist. Die übrigen Gene codieren Proteine aus dem Sekundärmetabolit-Cluster der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Biosynthese C13. Dabei handelt es sich um eine O-Methyltransferase, einen Teil einer Pigment-Polyketid-Synthase, ein sekretiertes Fasciclin-Domänen-Protein, eine sekretierte, Flavin-abhängige Monooxygenase sowie die Polyketid-Synthase FgPKS12 (Abb. 33).

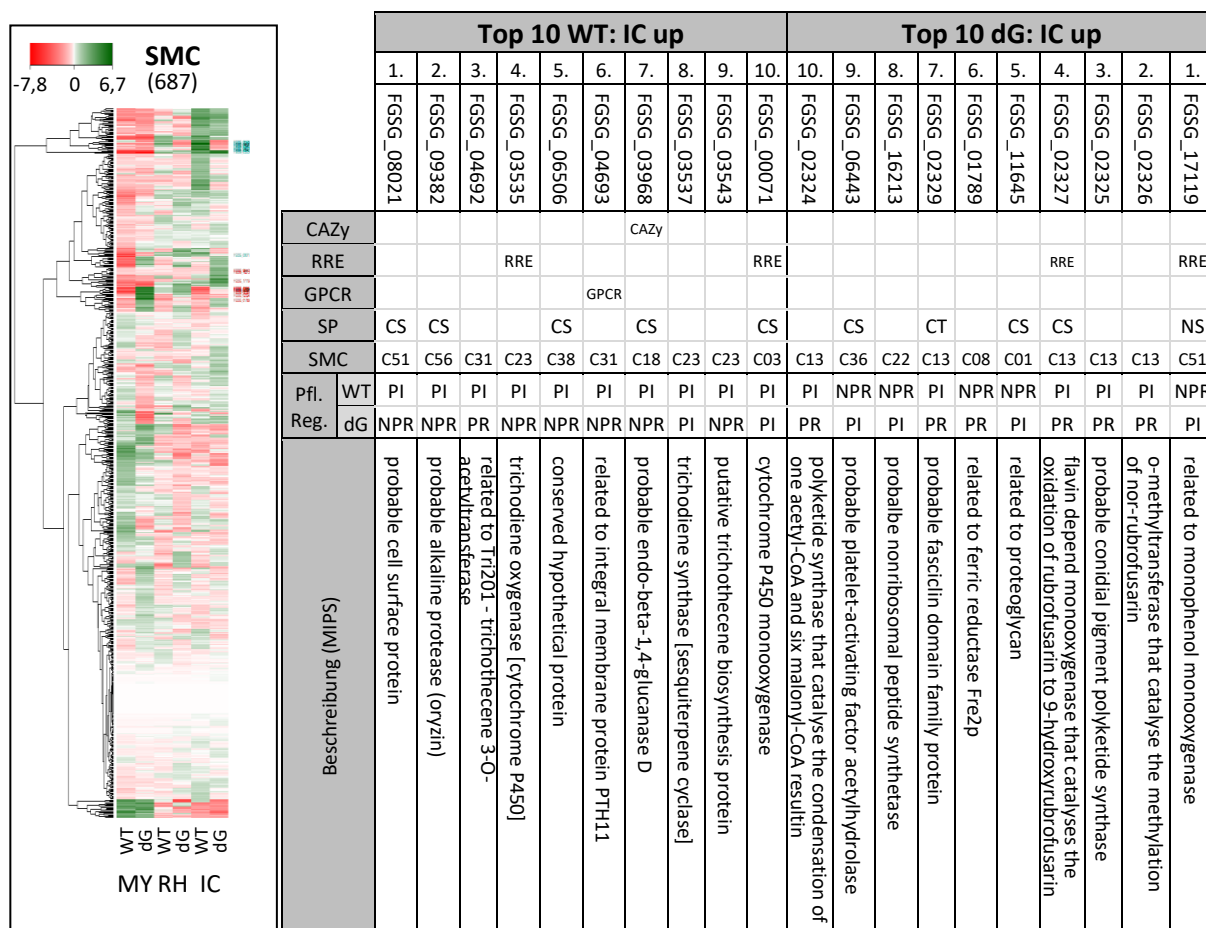


Abb. 33: Transkriptionsmuster der Gene in Sekundärmetabolit-Clustern in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Heatmap zeigt die Verteilung der Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten (SMC) in den drei Zelltypen Myzel (MY), Laufhyphen (RH) und Infektionskissen (IC) des Wildtyps 8/1 (WT) und der Δ Gpmk1 (dG). Verstärkt transkribierte Gene sind in Grün und weniger transkribierte Gene in Rot, Gene mit gleicher Transkriptionsstärke in Weiß dargestellt. Die zehn in einem Vergleich der Infektionskissen am stärksten hochregulierten Gene im jeweiligen Stamm sind neben der Heatmap jeweils für den Wildtyp 8/1 in Cyan und die Δ Gpmk1 in Rot gekennzeichnet und in der Tabelle als „Top 10“ mit Rang, Locus-ID, funktionaler Kategorisierung, Pflanzen-Regulation und Beschreibung nach MIPS-Datenbank aufgeführt. Pfl.-Reg.: Pflanzen-Regulation, NPR: Gene mit unveränderter Pflanzen-Regulation, PI: Pflanzen-induziert, PR: Pflanzen-reprimierte, CAZy: kohlenhydrataktive Enzyme, RRE: Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies, GPCR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, SP: sekretierte Proteine (CS: Klassische Sekretion, CT: Klassische Sekretion mit Transmembrandomäne, NS: Nicht-klassische Sekretion).

3.3.2.4.5 Regulation des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1

Der Sekundärmetabolit-Cluster der Trichothecen-Biosynthese C23 (TRI-Cluster) ist in *F. graminearum* von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Infektion von Weizen. Daher wird das Expressionsprofil der insgesamt 15 Cluster-Gene im Myzel, den Laufhyphen und den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 zusätzlich gesondert betrachtet. Hierfür wurden die ermittelten FPKM des jeweiligen Gens zwischen den Transkriptom-Daten der beiden Stämme verglichen (Tab. 13).

Tab. 13: Expressionsprofil des Trichothecen-Sekundärmetabolit-Clusters in Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1. Expressionsniveau der Gene des Trichothecen (TRI)-Clusters jeweils im Myzel (MY) den Laufhyphen (RH) und den Infektionskissen (IC) in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Datenbalken (grau) zeigen den relativen Anteil der Expression eines Gens über die verschiedenen Transkriptom-Datensätze. Bez.: Bezeichnung, FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped.

Gen ID	Bez.	FPKM					
		Wildtyp 8/1			Δ Gpmk1		
		MY	RH	IC	MY	RH	IC
FGSG_03529	–	563,119	315,211	302,281	290,251	682,826	1181,850
FGSG_03530	–	0,689	3,947	15,333	1,122	3,626	14,773
FGSG_03531	–	0,000	2,432	42,121	0,058	5,256	12,435
FGSG_03532	TRI8	4,805	20,691	90,998	6,221	15,308	13,608
FGSG_03533	TRI7	0,000	0,000	3,329	0,134	0,000	0,000
FGSG_03534	TRI3	0,000	0,718	28,764	0,000	0,232	0,000
FGSG_03535	TRI4	0,000	3,526	247,468	0,000	1,747	1,348
FGSG_03537	TRI5	3,234	7,692	147,696	0,831	7,243	1,285
FGSG_03538	TRI10	0,000	43,230	33,866	2,774	49,493	9,877
FGSG_03539	TRI9	13,540	91,655	1177,870	185,404	318,041	35,433
FGSG_03540	TRI11	0,000	33,987	59,415	2,140	25,482	2,685
FGSG_03541	TRI12	1,997	1,275	8,215	6,546	1,340	1,040
FGSG_03542	TRI13	0,000	0,000	8,572	0,000	0,000	0,000
FGSG_03543	TRI14	0,000	1,497	133,075	0,102	0,687	1,348
FGSG_16251	TRI6	0,000	0,897	34,882	0,130	3,188	1,034

Im Wildtyp 8/1 ist der Cluster hochgradig pflanzen-induziert: 13 Gene sind in den auf der Pflanze gebildeten Strukturen höher exprimiert als im Myzel. Nur zwei Gene (FGSG_03529, FGSG_03541) werden auf der Pflanze und in der Myzelkultur in gleichem Maße transkribiert. In der Δ Gpmk1 sind hingegen nur sechs Cluster-Gene pflanzen-induziert. Die restlichen Gene werden im Vergleich zum Myzel in ähnlicher oder verringerter Stärke exprimiert. Insbesondere die Trichodien-Synthase TRI5 (FGSG_03537), das Schlüssel-Enzym des Clusters, wird in der Δ Gpmk1 nicht nennenswert transkribiert. Zusätzlich sind, im Gegensatz zum Wildtyp 8/1, die zwei Regulatoren des Clusters TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538) in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 nicht hochreguliert (Tab. 13).

Die Gene TRI5 und TRI6 werden im Wildtyp 8/1 ausschließlich in den Infektionskissen stark transkribiert. Das Gen TRI10 wird in den Laufhyphen und Infektionskissen auf gleichem Niveau exprimiert. In der Δ Gpmk1 wird TRI10 nur in den Laufhyphen wie im Wildtyp 8/1 transkribiert, während es in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 deutlich herunterreguliert wird. Das erste Gen des Clusters (FGSG_03529) wird als einziges in der Δ Gpmk1 auf der Pflanze generell höher exprimiert als im Wildtyp 8/1 (Tab. 13).

3.4 Erstellung und Charakterisierung verschiedener Mutanten von Kandidatengenen, abgeleitet aus der differentiellen Transkriptomanalyse

Die vorangegangene differentielle Analyse der Transkriptome von Myzel, Laufhyphen und Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 wurde genutzt, um potentielle Kandidatengene für eine phänotypische Untersuchung zu identifizieren. Hierfür wurde die Funktion und potentielle Bedeutung während der frühen Infektionsphase auf Weizen sowie die Regulation in den drei Zelltypen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 betrachtet. Für diese Arbeit wurden neun Kandidatengene aus vier Gruppen selektiert (Tab. 14): Die erste Gruppe besteht aus dem gEgh16 Protein FGSG_00006, die zweite Gruppe aus den Regulatoren des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538), die dritte Gruppe aus zwei Regulatoren von G-Protein-Signalwegen FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597) sowie die letzte Gruppe aus vier putativen Effektorproteinen (FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514) mit einem hohen Expressionsniveau in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1.

Das gEgh16 Protein FGSG_00006 wird im Myzel des Wildtyps 8/1 nicht exprimiert. Die Transkription des codierenden Gens steigt in den Laufhyphen an und erreicht in den finalen Infektionskissen ihren höchsten Wert. In der Δ Gpmk1 wird das Gen hingegen in keinem der drei Zelltypen exprimiert (Tab. 14). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Deletion des Gens im Wildtyp 8/1 zu einer eingeschränkten Virulenz und eine Überexpression des Gens in der Δ Gpmk1 und dem Wildtyp 8/1 zu einer wiederhergestellten oder gesteigerten Pathogenität führen kann.

Der Regulator des TRI-Clusters TRI6 wird nur in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 nennenswert transkribiert. Der Regulator TRI10 hingegen wird sowohl in den Laufhyphen als auch den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und den Laufhyphen der Δ Gpmk1 exprimiert. In den Infektionskissen der Δ Gpmk1 ist die Transkription hingegen stark verringert (Tab. 14). Dieses Expressionsprofil führte zu der Überlegung, ob eine Überexpression der beiden Gene in der Δ Gpmk1 in einer Restauration der Trichothecen-Biosynthese und somit auch der Virulenz resultiert.

Die Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA und FgFlbB sind in der Δ Gpmk1 insgesamt und insbesondere in den Laufhyphen (FGSG_03597) bzw. Infektionskissen (FGSG_16620) wesentlich stärker transkribiert als im Wildtyp 8/1 (Tab. 14). Somit stellte sich die Frage, ob eine Überexpression dieser Gene im Wildtyp 8/1 eine Verminderung der Pathogenität auf Weizen zur Folge hat.

Die codierenden Gene der putativen Effektorproteine werden alle in einem hohen Maß in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 transkribiert. Eine Expression der Gene fehlt hingegen in der Δ Gpmk1 vollständig oder ist im Vergleich zum Wildtyp 8/1 zu vernachlässigen (Tab. 14). Die aus diesem Grund aufgestellte Hypothese war, ob eine Deletion der Gene dieser Proteine im Wildtyp 8/1 eine verringerte Virulenz auf Weizen bedeutet.

Tab. 14: Expressionsprofil ausgewählter Kandidatengene zur weiterführenden Charakterisierung in Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1. Expressionsniveau verschiedener Kandidatengene zur weiteren phänotypischen und molekularen Charakterisierung in *F. graminearum* jeweils im Myzel (MY) den Laufhyphen (RH) und den Infektionskissen (IC) in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1. Die Datenbalken (grau) zeigen den relativen Anteil der Expression eines Gens über die verschiedenen Transkriptom-Daten. Bez.: Bezeichnung, RGS: Regulatoren von G-Protein Signalwegen, PE: Putative Effektorproteine, FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped.

Gen ID	Bez.	FPKM					
		Wildtyp 8/1			Δ Gpmk1		
		MY	RH	IC	MY	RH	IC
FGSG_00006	gEgh16	0,108	20,608	47,278	0,034	0,000	0,557
FGSG_03538	TRI10	0,000	43,230	33,866	2,774	49,493	9,877
FGSG_16251	TRI6	0,000	0,897	34,882	0,130	3,188	1,034
FGSG_03597	FgFlbB	0,000	15,698	22,363	13,085	169,422	80,764
FGSG_16620	FgFlbA	11,445	26,062	11,488	37,304	29,342	49,323
FGSG_02685	PE	0,000	3,198	216,797	3,839	5,293	5,262
FGSG_07026	PE	46,995	931,509	9855,390	3,223	5,941	6,764
FGSG_11047	PE	0,000	31,428	1783,330	0,101	0,000	0,496
FGSG_12514	PE	0,000	38,605	428,863	0,000	0,000	0,000

3.4.1 Das gEgh16 Protein FGSG_00006

3.4.1.1 Charakterisierung der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006

3.4.1.1.1 Deletion des gEgh16 Proteins FGSG_00006 im Wildtyp 8/1

Zur Konstruktion der Deletionsmutante des gEgh16 Protein codierenden Gens FGSG_00006 wurde eine Gen-Substitution mit der Nourseothricin-Resistenzkassette (NAT) mittels homologer Rekombination durch doppeltes Crossing-Over an Gen-flankierenden Bereichen im Genom des Wildtyps 8/1 durchgeführt. Hierfür wurde ein Knockout-Vektor durch Hefe-Rekombinations-Klonierung (2.2.10) zusammengefügt. Der so erhaltene Vektor „p Δ 00006“ enthält das KO-Konstrukt bestehend aus linker und rechter Gen-Flanken sowie der Resistenzkassette für Nourseothricin (Anhang A). Der Vektor wurde mittels *E. coli* vervielfältigt (2.2.5, 2.2.6) und zum Erhalt des KO-Konstrukts mit den Restriktionsendonukleasen *Sall* und *SpeI* restringiert (2.2.8). Das Konstrukt wurde über eine Silica-Säule aufgereinigt (2.2.3) und 5 µg des reinen KO-Konstrukts wurden für die Transformation des *F. graminearum* Wildtyps 8/1 eingesetzt (2.2.12).

Zur Selektion und Kultivierung der erhaltenen Transformanten (#1942) (2.2.12) wurde ein CM-Festmedium mit einem Zusatz von Nourseothricin in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Zur Kontrolle der selektierten Mutanten wurden eine diagnostische PCR (2.2.1.1) und eine Southern-Blot-Analyse (2.2.16) auf eine erfolgreiche Deletion des Gens durchgeführt.

Die Untersuchung mittels PCR wurde auf einen internen Bereich des potentiell ausgeschalteten Gens FGSG_00006 mit den Oligonukleotiden „00006_int_for“ und „00006_int_rev“ vorgenommen. Das Gen-interne Fragment (403 bp) konnte wie erwartet in der Wildtyp 8/1-Kontrolle amplifiziert werden. In neun der zwölf getesteten Transformanten konnte das Fragment hingegen nicht amplifiziert werden. Die PCR auf ein internes Fragment des nicht modifizierten Gens FGSG_00645 (Primer: „GScreen_for“ und „GScreen_rev“, 772 bp) konnte in allen Proben erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 34C). Von den neun ermittelten Deletionsmutanten wurden Konidien vereinzelt (2.2.12) und zwei für die weitere Untersuchung mittels Southern-Blot-Analyse ausgewählt.

Die Modifikation des Genoms durch den Austausch des Gens FGSG_00006 mit der Nourseothricin-Resistenzkassette verändert das Restriktionsmuster bei einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *MfeI*: Im Wildtyp 8/1 Genom führt ein Verdau mit *MfeI* zu einem Fragment mit einer Größe von 1727 bp im Bereich der linken Genflanke. Durch die Deletion des Gens ist das resultierende Fragment im modifizierten Bereich 2297 bp lang. Dies ist ein Unterschied von 570 bp, welcher durch eine Hybridisierung der Southern-Blot-Sonde auf die linke Genflanke (PCR-Primer: „00006_SonLF_for“ und „00006_SonLF_rev“) zur Erkennung der potentiellen Deletion des FGSG_00006 genutzt wird (Abb. 34A).

Der durchgeführte Southern-Blot zeigte die erwarteten Fragmente für den Wildtyp 8/1 und die zwei getesteten Transformanten #1942.2.2 und #1942.8.2. Bei der dritten Transformante konnte eine ektopische Integration des KO-Konstrukts mit einem zusätzlich zum Wildtyp-Fragment detektierten Fragment mit einer Größe von etwa 2500 bp nachgewiesen werden (Abb. 34B).

Zusammenfassend konnten insgesamt neun Deletionsmutanten generiert werden, von denen bei zwei Mutanten mittels PCR-Diagnose und Southern-Blot-Analyse das Fehlen des Gens FGSG_00006 eindeutig bestätigt werden konnte. Die zwei Mutanten werden in der folgenden Charakterisierung zusammengefasst als Δ_{WT} FGSG_00006 behandelt oder bei individueller Betrachtung mit der zusätzlichen Bezeichnung M1 und M2 versehen.

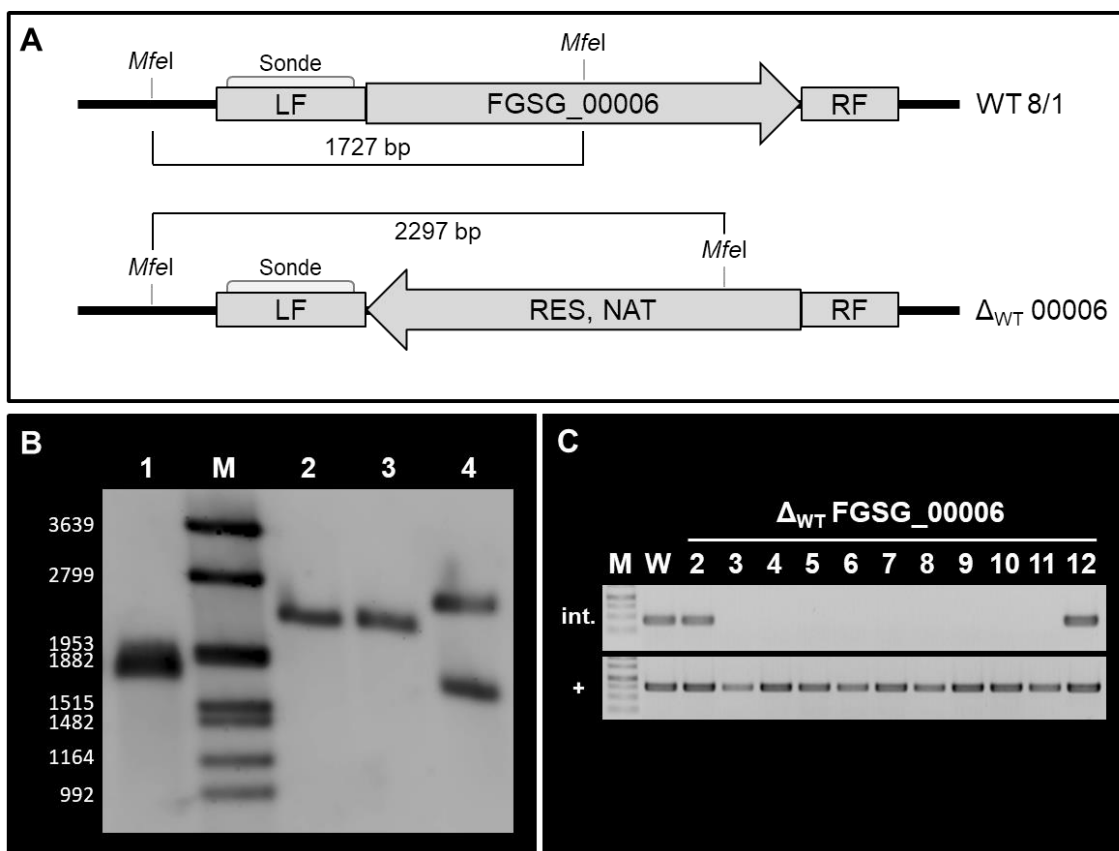


Abb. 34: Konstruktion und Analyse der Δ_{WT} FGSG_00006-Mutante. **A:** Schema zur KO-Mutanten-Konstruktion und Theorie zur Southern-Blot-Analyse. DNA-Abschnitt des Wildtyps 8/1 (WT 8/1) und der Δ_{WT} FGSG_00006-Mutante. In der Deletionsmutante wurde das Gen FGSG_00006 durch die Resistenzkassette für Nourseothricin (RES, NAT) ersetzt. Dadurch ändert sich die Größe der Fragmente bei einem Restriktionsverdau mit der Endonuklease *MfeI*. Die resultierenden Fragmente bei Hybridisierung der Southern-Blot Sonde mit einer Sequenz in der linken Flanke (LF) sind 1727 bp im Wildtyp 8/1 und 2297 bp in der Δ_{WT} FGSG_00006-Mutante groß. **B:** Southern-Blot auf Deletion des Gens FGSG_00006. Hybridisierung mit Sonde auf linker Flanke (LF). 1: gDNA #1526.4.4 (8/1 DsRed), M: Dig labeled Marker VII, 2: #1942.2.2 (KO, M1), 3: #1942.8.2 (KO, M2), 4: #1942.1.2 (Ektop). **C:** PCR zur Analyse der Δ_{WT} FGSG_00006 Transformanten (#1942.x). Oberes Gel: Synthese eines Gen-internen Fragments des Gens FGSG_00006 (int.), unteres Gel: Synthese des nicht modifizierten Gens FGSG_00845 zur Kontrolle (+). M: Generuler 1kb, W: gDNA 8/1 DsRed, 2 bis 12: gDNA #1942.1 bis #1942.11.

3.4.1.1.2 Infektionsstudie mit der Δ_{WT} FGSG_00006 auf Weizen

Zur Untersuchung des Einflusses einer Deletion des von dem Gen FGSG_00006 codierten gEgh16 Proteins auf den Infektionsprozess von *F. graminearum* wurde eine Infektionsstudie auf Weizen durchgeführt. Hierfür wurden das *F. graminearum*-anfällige Kultivar 'Nandu' und das Kultivar 'Amaretto', welches eine erhöhte natürliche Resistenz gegenüber einer Infektion mit *F. graminearum* besitzt, verwendet und 21 Tagen nach der Inokulation mit den Konidien des jeweiligen Stamms dokumentiert (2.2.17.1).

Die Inokulation einer Weizenähre des Kultivars 'Nandu' mit dem Wildtyp 8/1 führte zu einer vollständigen Infektion und dem daraus folgendem Ausbleichen der Ähre. Wie erwartet, konnte die $\Delta Gpmk1$ hingegen nur Nekrosen an Palea und Lemma des inokulierten Ährchens auslösen. Die übrige Ähre ist vergleichbar mit der nicht-infizierten Scheininokulation mit sterilem Wasser. Die Inokulation mit der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006 führte zu einer vollständigen Infektion der Ähre, die der des Wildtyps 8/1 gleicht (Abb. 35A).

Die Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Amaretto' zeigte für den Wildtyp 8/1 eine deutlich reduzierte Infektion der Ähre. Insgesamt konnten nur etwa 12 % der Ähre durch den Pilz infiziert werden. Die $\Delta Gpmk1$ konnte in diesem Fall keine Nekrosen des inokulierten Ährchens verursachen. Die Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 konnte durchschnittlich etwa 58 % der beimpften Ähre infizieren. Dies ist im Vergleich mit dem Wildtyp 8/1 eine Steigerung des infizierten Anteils der Ähre um etwa 46 % (Abb. 35B, Abb. 36).



Abb. 35: Infektionsstudie auf Weizen mit der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006. Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu' **(A)**, Kultivar 'Amaretto' **(B)**) durch den Wildtyp 8/1, die $\Delta Gpmk1$ und durch zwei unabhängige Mutanten der Δ_{WT} FGSG_00006 (M1 und M2), jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H_2O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet.

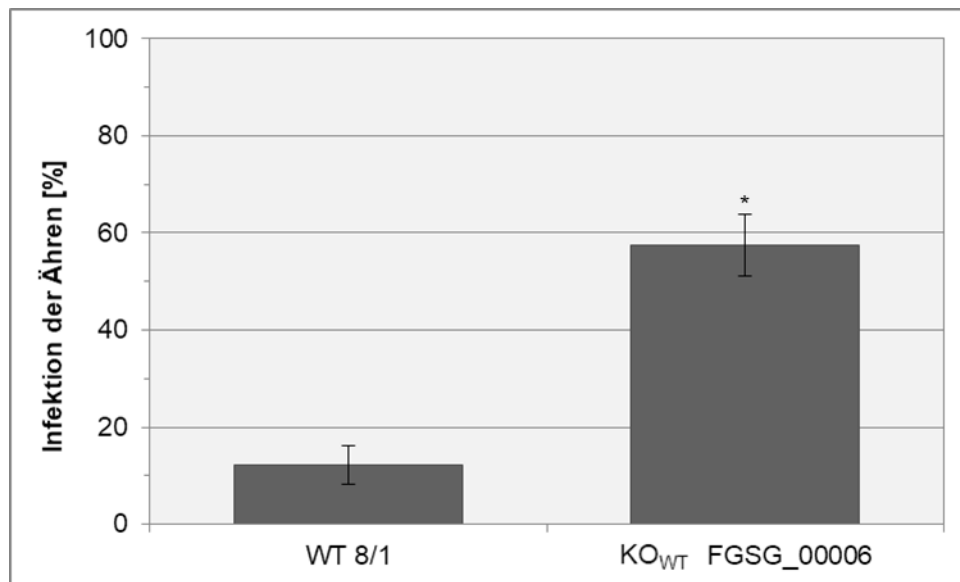


Abb. 36: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar ‘Amaretto’ mit der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006. Relative Infektion einer Ähre (21 dpi) durch den Wildtyp 8/1 und die Δ_{WT} FGSG_00006. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^* \leq 0,0025$.

3.4.1.1.3 Asexuelle Reproduktion der Δ_{WT} FGSG_00006

Zur Untersuchung der asexuellen Reproduktion der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 wurde die Produktion von Konidien durch eine Inokulation von flüssigem Induktionsmedium aus Weizenblättern eingeleitet und nach sechs Tagen in Relation zum Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ ausgewertet (2.2.13). Der Wildtyp 8/1 hat innerhalb der Inkubationszeit etwa 64 Konidien pro μl gebildet und die $\Delta Gpmk1$ etwa 122 Konidien pro μl . Die Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 hat etwa 89 Konidien pro μl gebildet, was einer signifikanten Erhöhung der Produktion von Konidien um etwa 38 % entspricht (Abb. 37).

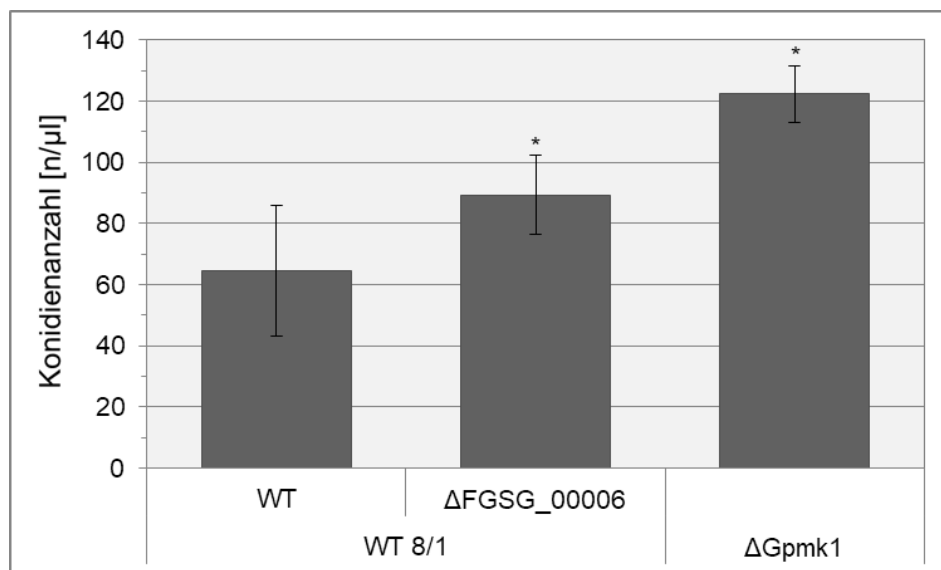


Abb. 37: Asexuelle Reproduktion der Δ_{WT} FGSG_00006 in flüssigem Weizenmedium. Die Produktion von Konidien des Wildtyps 8/1, der $\Delta Gpmk1$ und der Δ_{WT} FGSG_00006 wurde durch Zählung der gebildeten Konidien (6 dpi) untersucht. Es wurden drei biologische Replikate von zwei unabhängigen Deletionsmutanten ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^* \leq 0,000025$.

3.4.1.1.4 Die Δ_{WT} FGSG_00006 unter osmotischem und oxidativem Stress

Die potentielle Auswirkung der Modifikation in der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 auf die Toleranz gegenüber osmotischem und oxidativem Stress wurde anhand einer Wachstumsstudie auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von Natriumchlorid (NaCl) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in verschiedenen Konzentrationen untersucht (2.2.18).

Bereits auf CM-Festmedium ohne einen stressauslösenden Zusatz zeigte die Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 ein im Vergleich zum Wildtyp 8/1 um etwa 10 % gesteigertes Wachstum (Abb. 38, Abb. 39).

Durch die Zugabe von 0,8 M NaCl erhöhte sich der Koloniedurchmesser sowohl beim Wildtyp 8/1 als auch bei der Mutante in ähnlichem Maß. Im Vergleich zur $\Delta Gpmk1$ lag das zusätzliche Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 bei etwa 14 %, da der wachstumsfördernde Effekt einer Zugabe von 0,8 M NaCl bei der $\Delta Gpmk1$ nicht auftritt und sogar eine Verringerung des Wachstums um etwa 5 % beobachtet wurde (Abb. 38, Abb. 39).

Die Supplementation des Mediums mit 1,2 M NaCl führte bei allen drei Stämmen zu einer Reduktion des normalen Wachstums. Das Wachstum der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 verringerte sich um etwa 10 % und lag damit bei einem Koloniedurchmesser des Wildtyps 8/1 ohne Stress. Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ ist die Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 weniger sensitiv gegenüber osmotischem Stress, da das Wachstum der Mutante um etwa 8 % bzw. 17 % weniger reduziert wurde (Abb. 38, Abb. 39).

Die Zugabe von H_2O_2 führte in allen verwendeten Konzentrationen (10 mM, 15 mM und 20 mM) zu einer Reduktion des Wachstums der getesteten Stämme auf CM-Festmedium. Der Einfluss von H_2O_2 auf den Wildtyp 8/1 und die $\Delta Gpmk1$ war vergleichbar mit einem nahezu proportionalen Verlauf der Wachstumsreduktion in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration. Die Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 ist signifikant weniger anfällig gegenüber oxidativem Stress. Mit der resultierenden Koloniegröße, die bei 10 mM H_2O_2 um etwa 5 %, bei 15 mM H_2O_2 um etwa 6 % und bei 20 mM H_2O_2 um etwa 14 % verringert war, wurde die Mutante also im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen durch die ansteigenden Konzentrationen von H_2O_2 um etwa 4 %, 10 % bzw. 12 % weniger inhibiert (Abb. 40, Abb. 41).

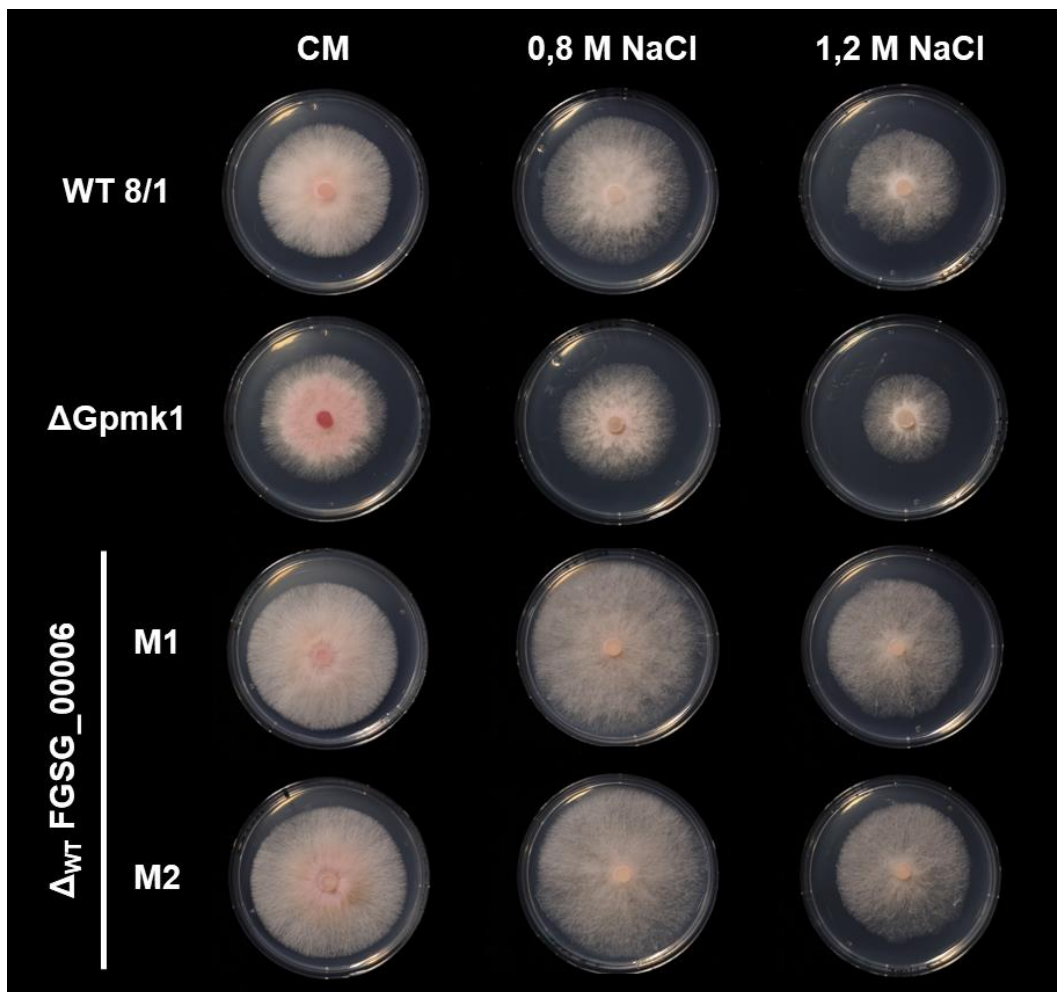


Abb. 38: Wachstum der $\Delta_{WT} FGSG_00006$ unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die $\Delta Gpmk1$ und zwei unabhängige Mutanten der $\Delta_{WT} FGSG_00006$ (M1 und M2) verwendet.

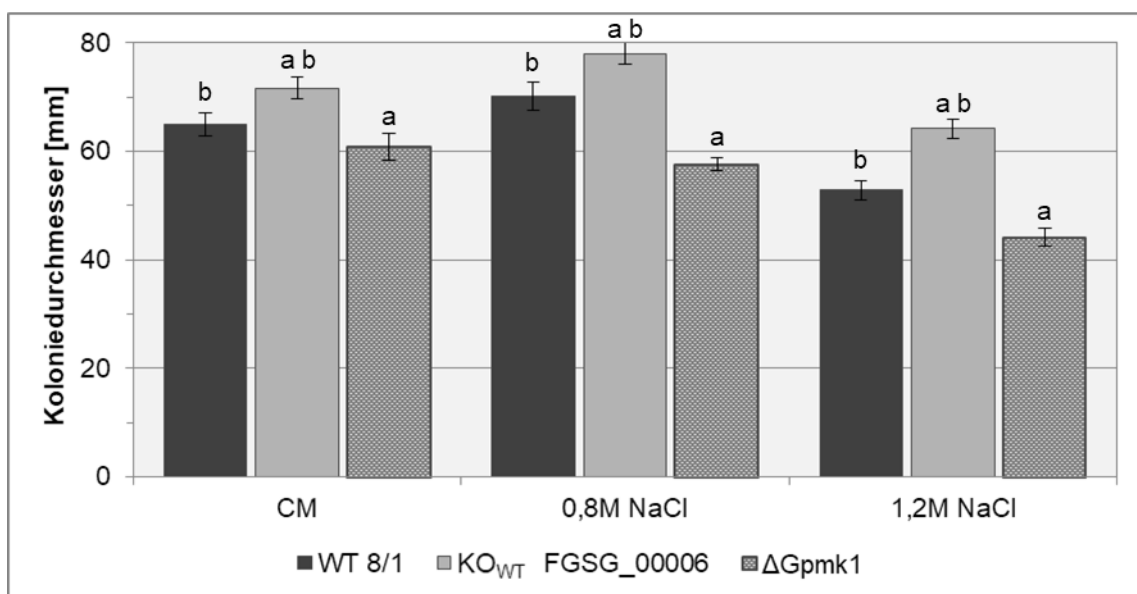


Abb. 39: Wachstum der $\Delta_{WT} FGSG_00006$ unter hyperosmotischen Bedingungen. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl gemessen (3 dpi). Es wurden jeweils 16 Replikate des Wildtyps 8/1, der $\Delta Gpmk1$ und zwei unabhängiger Mutanten der $\Delta_{WT} FGSG_00006$ verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. $\Delta Gpmk1$. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

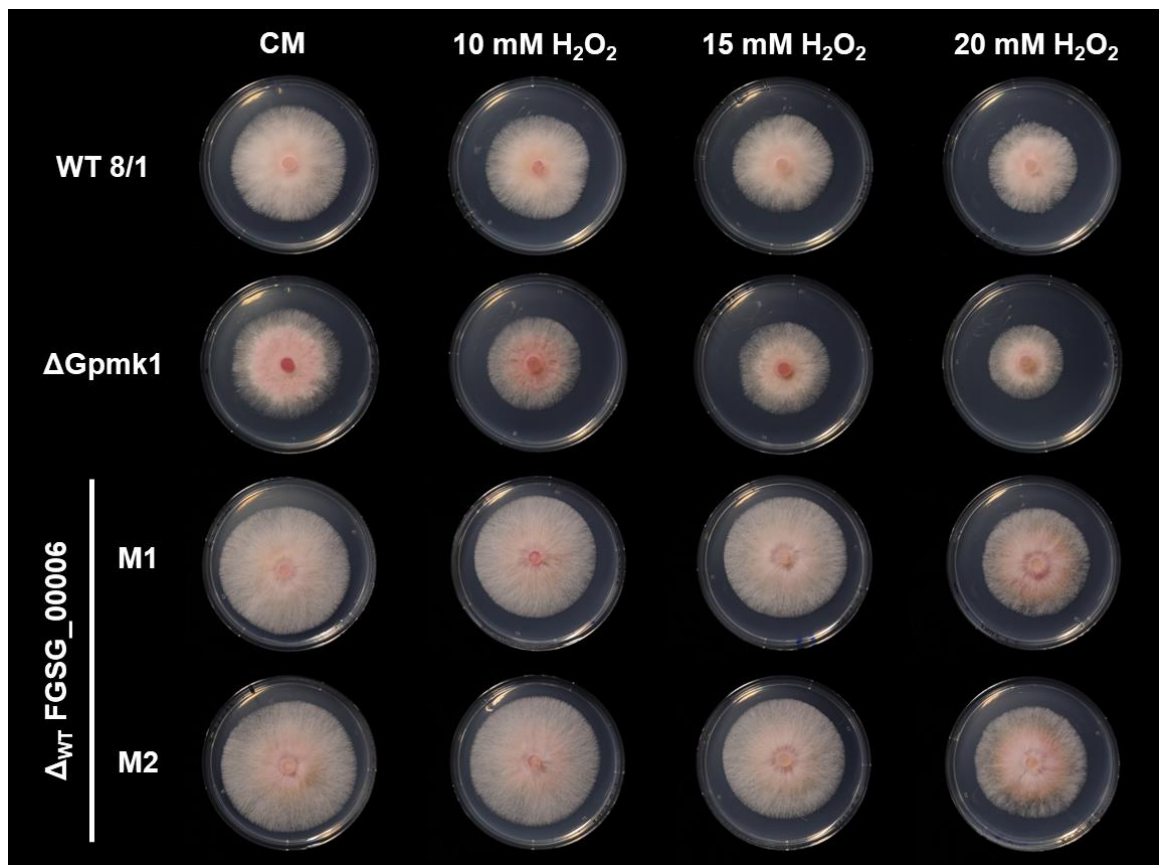


Abb. 40: Wachstum der Δ_{wt} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H_2O_2 bzw. 15 mM und 20 mM H_2O_2 untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die $\Delta Gpmk1$ und zwei unabhängige Mutanten der Δ_{wt} FGSG_00006 (M1 und M2) verwendet.

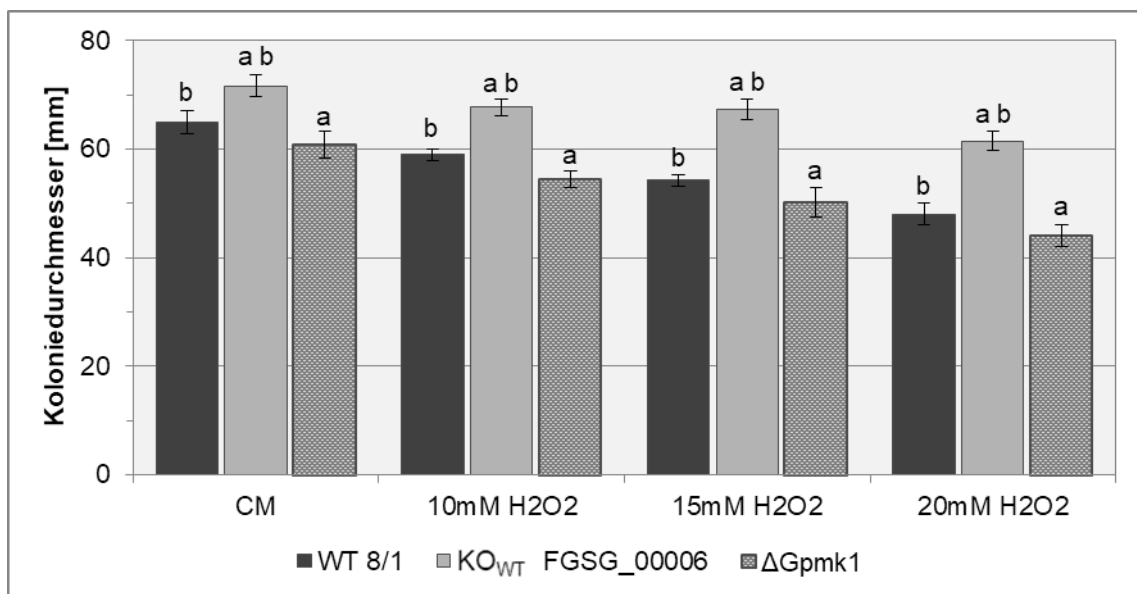


Abb. 41: Wachstum der Δ_{wt} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H_2O_2 bzw. 15 mM und 20 mM H_2O_2 untersucht (3 dpi). Es wurden jeweils 16 Replikate des Wildtyps 8/1, der $\Delta Gpmk1$ und zwei unabhängiger Mutanten der Δ_{wt} FGSG_00006 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggü. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggü. $\Delta Gpmk1$. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

3.4.1.1.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der Δ_{WT} FGSG_00006

Um den generellen Oxidationszustand der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 während des Wachstums auf CM-Festmedium zu untersuchen, wurde eine Detektion von ROS mittels Färbung mit dem Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) durchgeführt. NBT reagiert mit anwesendem Superoxid (O_2^-) und bildet eine blaue Ausfärbung in Abhängigkeit von der Superoxid-Konzentration (2.2.19).

Der Wildtyp 8/1 und die $\Delta Gpmk1$ zeigten beide einen deutlichen blaugefärbten Ring am Rand der gewachsenen Kolonie. Auch das restliche Myzel war leicht blau angefärbt. Bei der $\Delta Gpmk1$ war insbesondere das älteste Myzel im Zentrum der Kolonie deutlich dunkelblau gefärbt. Die rote Färbung war der natürlich von *F. graminearum* gebildete Farbstoff Aurofusarin und stand nicht in Verbindung mit ROS oder der NBT-Färbung. (Abb. 42). Die Kolonien der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 zeigten den äußeren dunkel gefärbten Ring nicht. In diesem Bereich lag also, im Vergleich mit den Referenzstämmen, eine geringere Konzentration von ROS vor. Die gesamte Kolonie war zudem etwas weniger angefärbt als der Wildtyp 8/1 oder die $\Delta Gpmk1$. Die Δ_{WT} FGSG_00006 befindet sich demnach in einen allgemein geringeren Oxidationszustand (Abb. 42).

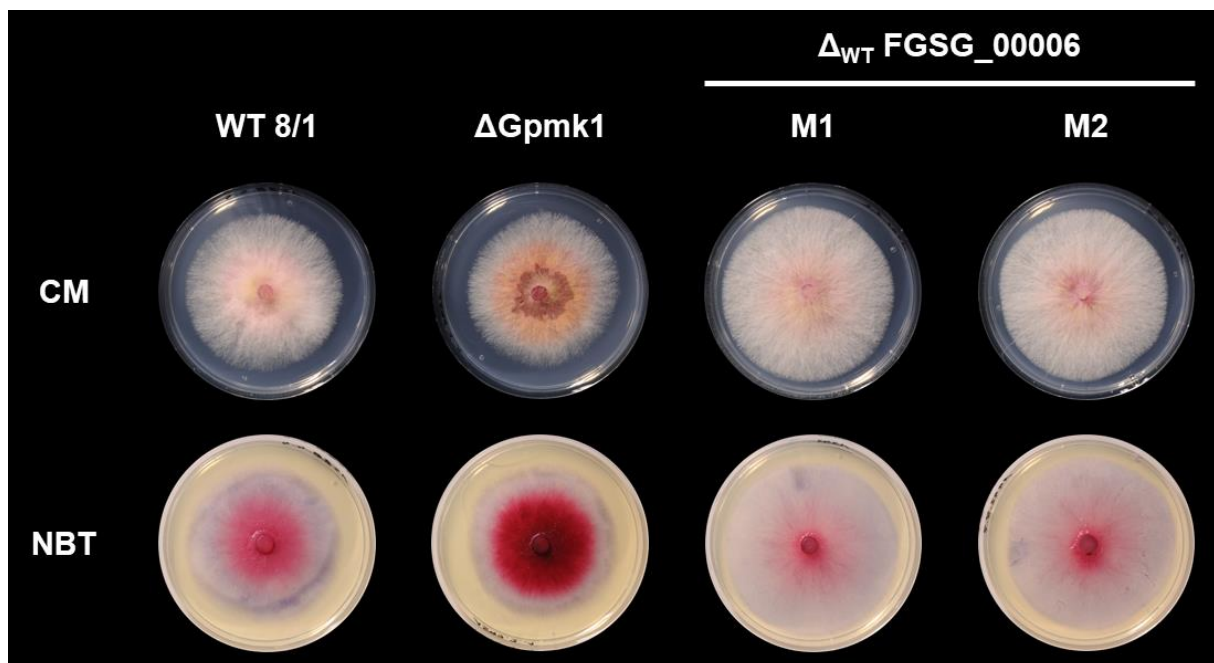


Abb. 42: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beim Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Der Oxidationszustand des Pilzes wurde nach Wachstum auf CM-Festmedium (3 dpi) durch Färbung mit NBT untersucht. Es wurden jeweils drei biologische Replikate des Wildtyps 8/1, der $\Delta Gpmk1$ und zwei unabhängiger Mutanten der Δ_{WT} FGSG_00006 verwendet. CM: Unbehandelte Kolonie, NBT: Gefärbte Kolonie (dunkelblaue Färbung).

3.4.1.1.6 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Infektion von Weizenpaleae durch die Δ_{WT} FGSG_00006

Die Formierung der für eine Infektion notwendigen Strukturen auf der Pflanzenoberfläche ist ein essentieller Bestandteil der Infektion von Weizen durch *F. graminearum*. Um den Effekt der Deletion des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 auf die Fähigkeit zur Ausbildung dieser Infektionsstrukturen zu untersuchen, wurden mit dem Wildtyp 8/1 und der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 inokulierte Weizenpaleae fluoreszenzmikroskopisch mittels CLSM betrachtet (2.2.21). Es wurden zuvor präparierte Paleae des Weizenkultivars 'Nandu' verwendet (2.2.17.2). Die Proben wurden sieben Tage nach der Inokulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff WGA-CF™ 488A angefärbt (2.2.21).

Bei der Betrachtung der Oberfläche einer vom Wildtyp 8/1 infizierten Palea zeigte sich ein ausgeprägtes Netzwerk von Laufhyphen, einzelnen Infektionskissen und singulären Aggregationen von Infektionsstrukturen (Abb. 43). Die gebildeten Infektionskissen hatten durchschnittlich eine Breite von etwa 20 μm . Von ihnen gingen viele intrazellulär gewachsenen Hyphen in das Pflanzengewebe aus (Abb. 43C-F). Die Ansammlungen von Infektionsstrukturen hatten etwa eine Breite von 100 bis 200 μm und bestanden aus mehreren Infektionsstrukturen, wie gelappten Appressorien und Infektionskissen (Abb. 43A-B).

Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 unterschied sich das von der Mutante Δ_{WT} FGSG_00006 gebildete Hyphennetzwerk auf der Pflanzenoberfläche nicht wesentlich (Abb. 44). Die Häufigkeit, mit der Infektionsstrukturen auf der Pflanzenoberfläche gebildet wurden, war so hoch, dass im Gegensatz zum Wildtyp 8/1 keine einzelnen Aggregationen dieser Strukturen erfasst werden konnten. Die Oberfläche war nahezu vollständig von Infektionsstrukturen besetzt (Abb. 44A-D). Die von der Δ_{WT} FGSG_00006 gebildeten Infektionskissen waren im Vergleich zum unmodifizierten Wildtyp 8/1 signifikant vergrößert und stärker verzweigt. Ein einzelnes Infektionskissen konnte eine Größe von etwa 100 bis 200 μm erreichen (Abb. 44E-F).

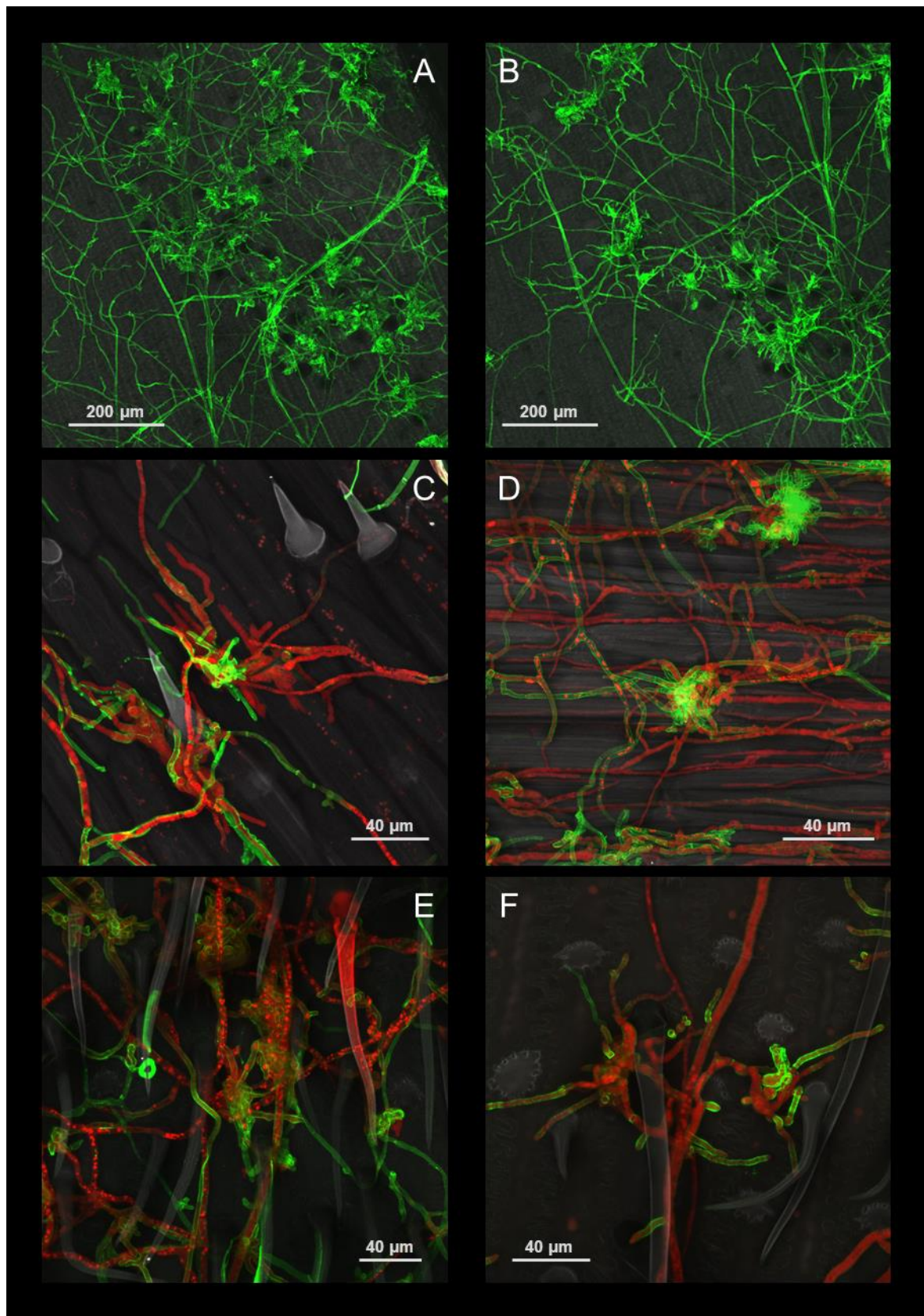


Abb. 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch den Wildtyp 8/1 (7 dpi). Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der Oberfläche von Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu'. **A+B:** Übersichtsaufnahme des Laufhyphennetzwerks und gebildeter Infektionsstrukturen. **C-F:** Infektionskissen von *F. graminearum*. Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz des mit WGA-CF™488A gefärbten Chitins (grün), Fluoreszenz eines konstitutiv und zytoplasmatisch exprimierten DsRed (rot). Maßstab: 200 µm bzw. 40 µm.

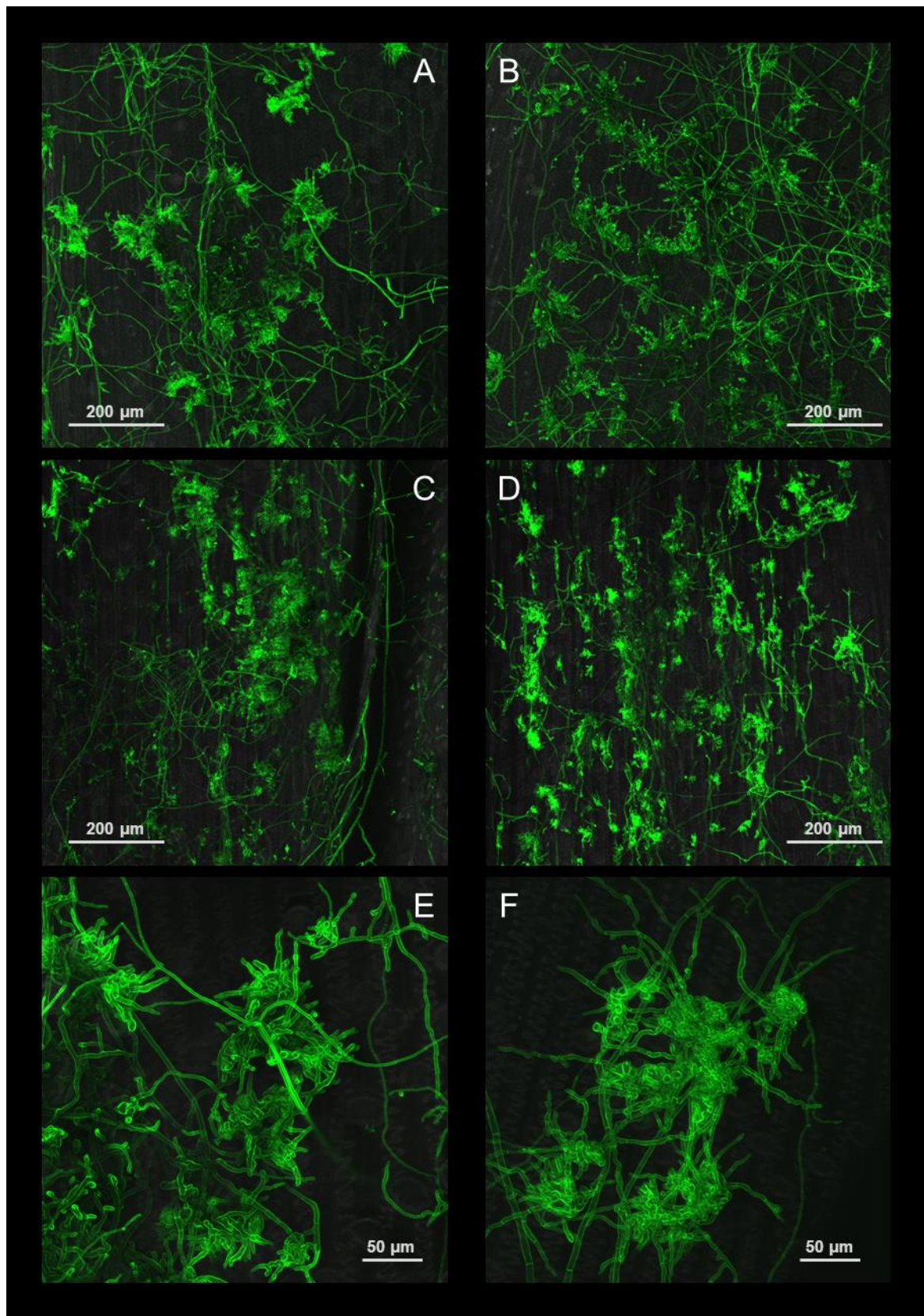


Abb. 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch die Δ_{wt} FGSG_00006 (7 dpi). Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der Oberfläche von Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu'. **A-D:** Übersichtsaufnahme des Laufhyphennetzwerks und gebildeter Infektionsstrukturen. **E+F:** Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 stark vergrößerte und komplexere Infektionskissen der Δ_{wt} FGSG_00006. Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz des mit WGA-CF™488A gefärbten Chitins (grün). Maßstab: 200 μ m bzw. 50 μ m.

3.4.1.2 Charakterisierung der Überexpressionsmutanten im Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1

3.4.1.2.1 Überexpression des gEgh16 Proteins FGSG_00006 in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1

Zur Überexpression des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 wurde ein Vektor konstruiert, in welchem das Gen durch den vorgeschalteten in *F. graminearum* konstitutiv exprimierenden Promotor *gpdA* aus *A. nidulans* reguliert wurde. Hierfür wurde das Gen mittels PCR (2.2.1.1) mit den Oligonukleotiden „00006_BamHI_for“ und „00006_NotI_rev“, welche zur gerichteten Ligation in den Überexpressionsvektor mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen wurden, aus dem Genom des *F. graminearum* Wildtyps 8/1 amplifiziert. Das erhaltene Amplikon wurde zur weiteren Verarbeitung in den Vektor „pJET1.2/blunt“ ligiert (2.2.4). Der so erstellte Vektor wurde über *E. coli* vervielfältigt (2.2.5, 2.2.6) und zur Isolation des FGSG_00006 aus diesem Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I verdaut (2.2.8). Das so erhaltene Fragment wurde über eine Silica-Säule aufgereinigt (2.2.3) und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor „pAN7.1_GluA“ ligiert (2.2.4). Der klonierte Vektor, nun als „pOE00006“ bezeichnet (Anhang B), wurde über *E. coli* amplifiziert (2.2.5, 2.2.6). Um die Integration zu kontrollieren, wurde der Vektor sequenziert (2.2.7) und anschließend für die Transformation von *F. graminearum* mit der Endonuklease *Ahd*I restringiert (2.2.8). Für die Transformation des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 wurden jeweils 7 µg des linearisierten Vektors verwendet (2.2.12).

Die erhaltenen Transformanten wurden zur Selektion auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von 100 µg pro ml des Antibiotikums Hygromycin B kultiviert (2.2.13) und nach einer Konidienvereinzelung (2.2.12) wurden für jeden vermuteten Überexpressionsstamm zwei unabhängige Transformanten zur Analyse mittels qRT-PCR ausgewählt (2.2.1.3). Für eine RNA-Isolation (2.2.15) und die folgende Synthese der cDNA (2.2.1.2) wurde drei Tage gewachsenes Myzel aus einer Flüssigkultur verwendet (2.2.13). Die qRT-PCR auf die cDNA der jeweiligen Transformante wurde auf eine 193 bp große Sequenz des potentiell überexprimierten Gens FGSG_00006 mit den Oligonukleotiden „00006_qPCR_for“ und „00006_qPCR_rev“ durchgeführt (2.2.1.3).

Das erstellte Transkriptionsprofil der Transformanten zeigte, dass das Gen in beiden untersuchten Mutanten des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 in einem signifikant erhöhten Niveau exprimiert werden (Abb. 45). In den zwei Mutanten des Wildtyps 8/1 M1 und M2 wurde das Gen etwa 1500- bzw. 1300-fach transkribiert. In den zwei Mutanten der Δ Gpmk1 M1 und M2 war die Transkription des Gens etwa um das 1500- bzw. 1200-fache gesteigert (Abb. 45).

Es konnten demnach erfolgreich jeweils zwei Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 identifiziert werden, welche in der folgenden Analyse als OE_{WT} FGSG_00006 und OE _{Δ G} FGSG_00006 bezeichnet werden. Bei individueller Betrachtung der getesteten Mutanten M1 und M2 wird diese Benennung weiterhin angewendet.

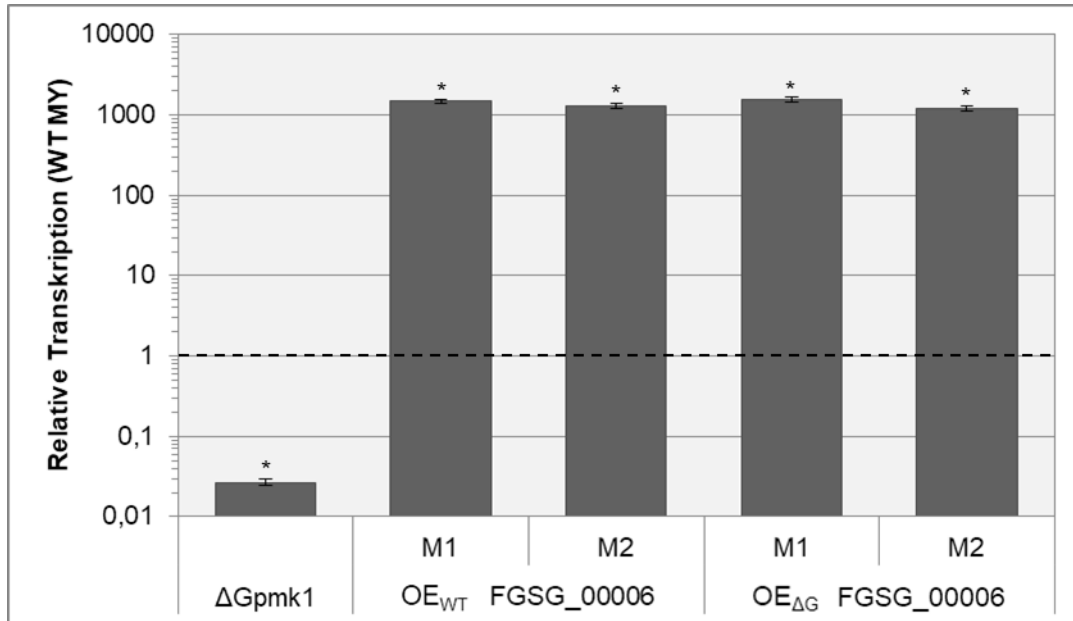


Abb. 45: Transkriptionsprofil des Gens FGSG_00006 in verschiedenen Mutanten in Relation zum Wildtyp 8/1. Die relative Transkription des FGSG_00006 in der Δ Gpmk1 und jeweils zweier unabhängiger Überexpressionsmutanten (M1 und M2) OE_{WT} FGSG_00006 und OE _{Δ G} FGSG_00006 im Vergleich zum Myzel des Wildtyps 8/1 (WT MY). Das Transkriptionsniveau des Wildtyps 8/1 wurde auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde cDNA aus dem jeweiligen Myzel verwendet (3 dpi). Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^*=0,00083$.

3.4.1.2.2 Infektionsstudie mit der OE_{WT} FGSG_00006 und OE _{Δ G} FGSG_00006 auf Weizen

Die Pathogenität der Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 wurde mittels einer Infektionsstudie auf Weizen untersucht. Hierfür wurde das *F. graminearum*-anfällige Weizenkultivar 'Nandu' mit Konidien der jeweiligen Mutante und den Referenzstämmen inokuliert und nach 21 Tagen ausgewertet (2.2.17.1).

Die Infektion des Weizens durch die Mutante OE_{WT} FGSG_00006 war im Vergleich zum Wildtyp 8/1 stark reduziert. Im Gegensatz zum Wildtyp 8/1, der die gesamte Ähre infizieren konnte, war die Infektion der Mutante OE_{WT} FGSG_00006 auf das inokulierte Ährchen beschränkt. Dies entspricht einer anteiligen Infektion der Weizenähre von etwa 9 % (Abb. 46, Abb. 47). Die Überexpression des Gens in der Mutante OE _{Δ G} FGSG_00006 führte zu einem mit dem Hintergrund Δ Gpmk1 identischen Infektionsverlauf. Ausschließlich Palea und Lemma des inokulierten Ährchens zeigte leichte Nekrosen (Abb. 48).

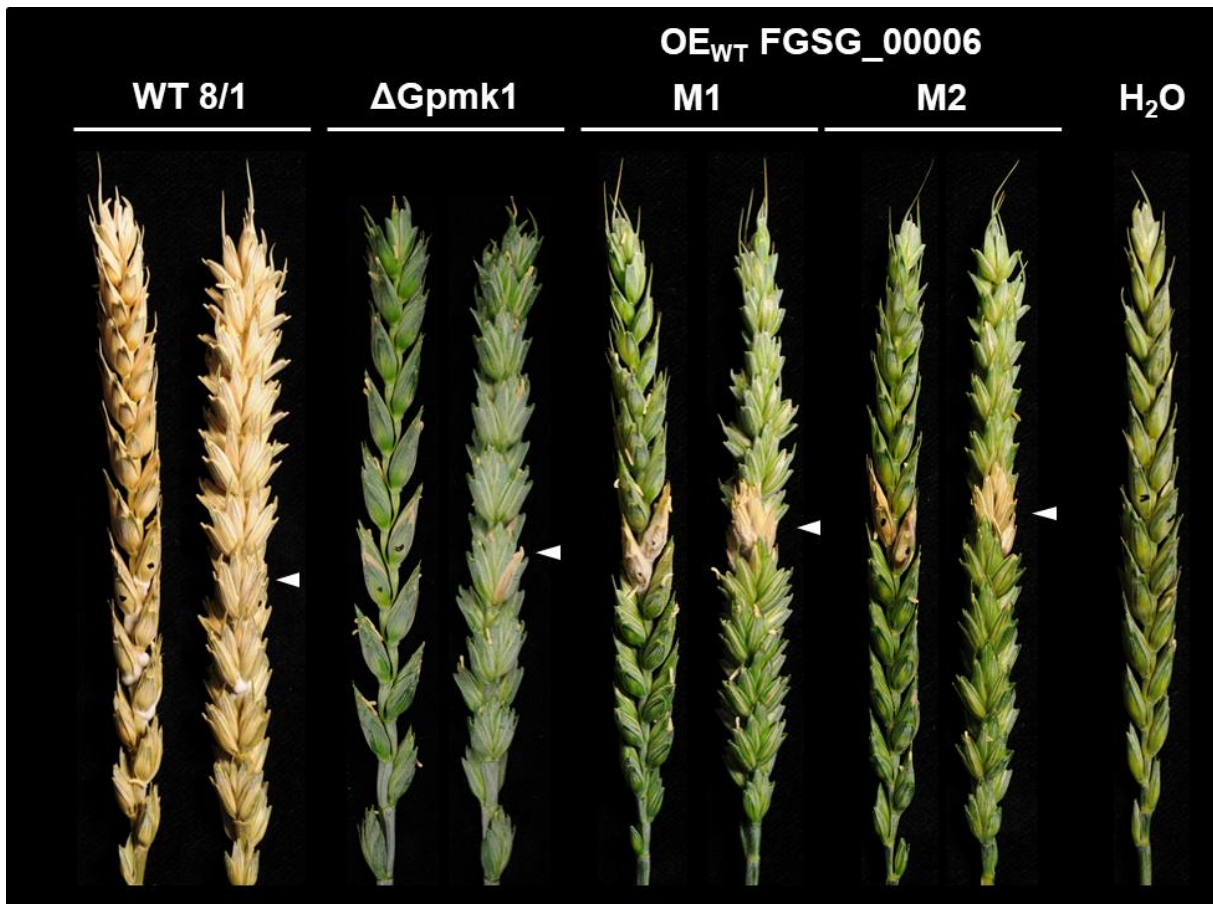


Abb. 46: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_00006. Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu') durch den Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und durch zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_00006 (M1 und M2) jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet.

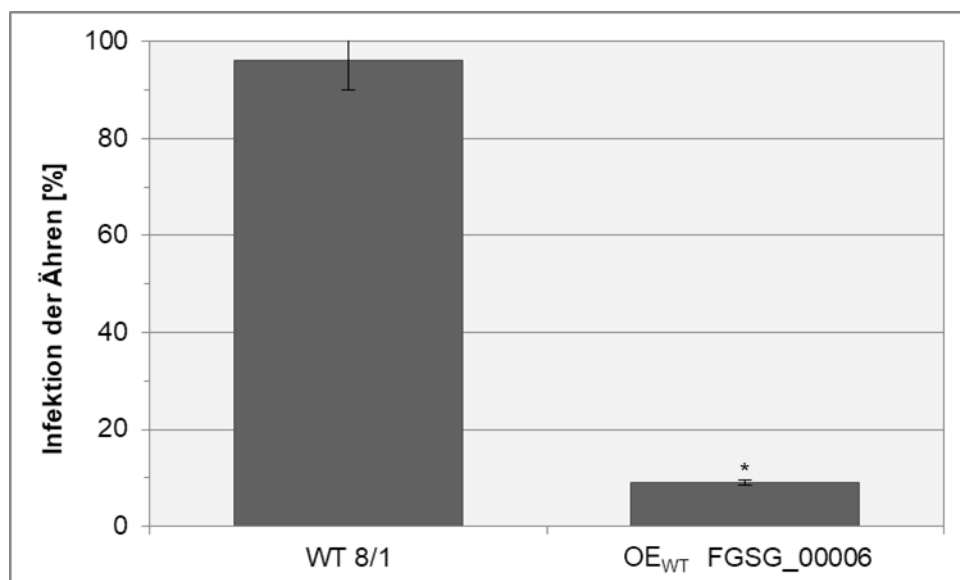


Abb. 47: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Nandu' mit der Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_00006. Relative Infektion einer Ähre (21 dpi) durch den Wildtyp 8/1 und die OE_{WT} FGSG_00006. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^* \leq 0,0025$.

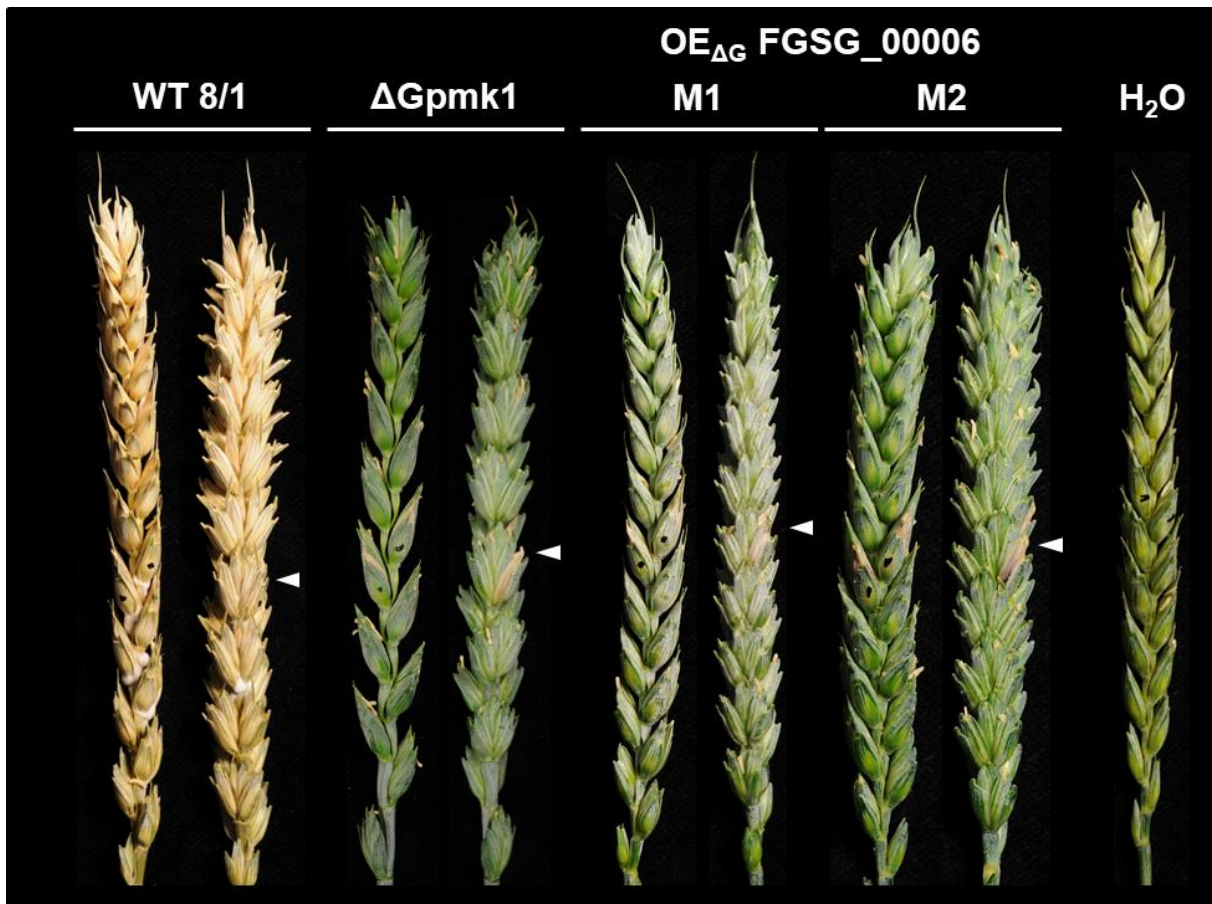


Abb. 48: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE_{ΔG} FGSG_00006. Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu') durch den Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und durch zwei unabhängige Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_00006 (M1 und M2) jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet.

3.4.1.2.3 Asexuelle Reproduktion der OE_{WT} FGSG_00006 und OE_{ΔG} FGSG_00006

Um potentielle Unterschiede in der asexuellen Reproduktion der Mutanten OE_{WT} FGSG_00006 und OE_{ΔG} FGSG_00006 zu erkennen, wurde durch Inkubation in flüssigem Medium aus Weizenblättern die Bildung von Konidien induziert und nach sechs Tagen im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 betrachtet (2.2.13).

Der Wildtyp 8/1 hat in diesem Zeitraum etwa 64 Konidien pro μl produziert. Die OE_{WT} FGSG_00006 hat im Vergleich dazu mit etwa 33 Konidien pro μl nur die Hälfte des Wildtyps 8/1 gebildet. Die ΔGpmk1 hat etwa 122 Konidien pro μl produziert. Die OE_{ΔG} FGSG_00006 hat demnach mit etwa 116 Konidien pro μl eine mit dem Ursprungstamm ΔGpmk1 vergleichbare Anzahl an Konidien erstellt (Abb. 49).

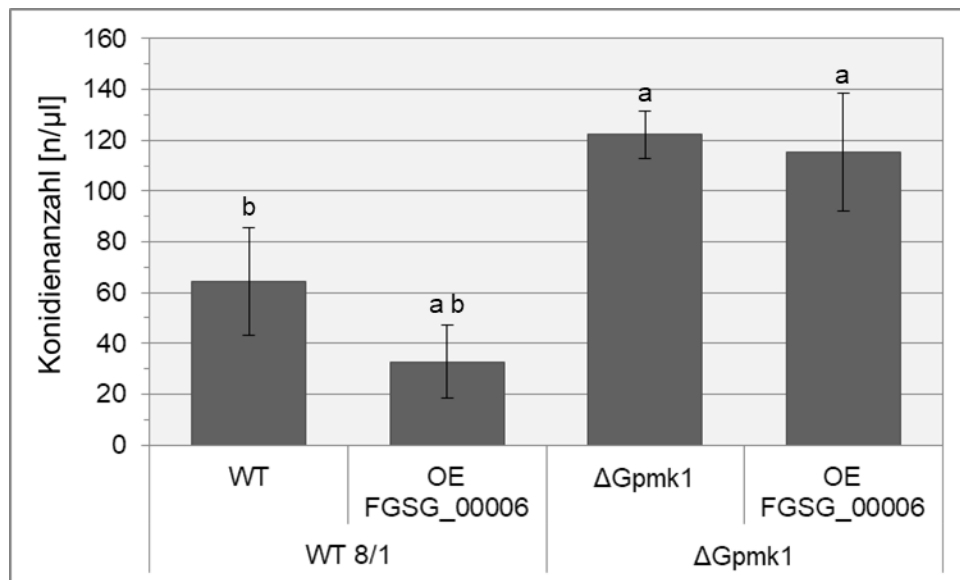


Abb. 49: Asexuelle Reproduktion der Überexpressionsmutanten OE_{WT} FGSG_00006 und OE_{ΔG} FGSG_00006 in flüssigem Weizenmedium. Die Produktion von Konidien des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1, der OE_{WT} FGSG_00006 und der OE_{ΔG} FGSG_00006 wurde durch Zählung der gebildeten Konidien (6 dpi) untersucht. Es wurden drei biologische Replikate von zwei unabhängigen Überexpressionsmutanten ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. ΔGpmk1. $p^{a,b} \leq 0,000025$.

3.4.1.2.4 Die OE_{WT} FGSG_00006 und OE_{ΔG} FGSG_00006 unter osmotischem und oxidativem Stress

Um den Einfluss der konstitutiven Expression des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 unter osmotischem und oxidativem Stress zu untersuchen, wurde eine Wachstumsstudie auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von Natriumchlorid (NaCl) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (2.2.18).

Die Überexpression des Gens führte in der Mutante OE_{WT} FGSG_00006 zu einem um etwa 4 % tendenziell leicht gesteigerten Wachstum im Vergleich zum unmodifizierten Wildtyp 8/1 auf CM-Festmedium ohne einen speziellen Zusatz (Abb. 50, Abb. 52).

Eine Zugabe von 0,8 M NaCl führte bei der Mutante OE_{WT} FGSG_00006 zu einem mit dem Wildtyp 8/1 vergleichbaren Anstieg des Wachstums. Auch die Mutante OE_{ΔG} FGSG_00006 zeigte eine Steigerung des Wachstums um etwa 2 %. Somit wird die Wachstumsreduktion des ΔGpmk1-Hintergrunds durch die Überexpression des FGSG_00006 kompensiert und führt zu einem um etwa 8 % gesteigerten Koloniedurchmesser im Vergleich zur ΔGpmk1 (Abb. 50, Abb. 51, Abb. 52).

Die Zugabe von 1,2 M NaCl verursachte bei allen getesteten Stämmen eine Reduktion des Wachstums. Mit einer Verringerung des Wachstums um etwa 12 % ist die Mutante OE_{WT} FGSG_00006 allerdings weniger anfällig gegenüber osmotischem Stress und zeigt im Vergleich zum Wildtyp 8/1 ein etwa 6 % erhöhtes Wachstum unter 1,2 M NaCl.

Die Reaktion der Mutante OE_{ΔG} FGSG_00006 war vergleichbar mit der des Transformationshintergrunds ΔGpmk1 (Abb. 50, Abb. 51, Abb. 52).

Unter oxidativem Stress durch die Zugabe von H₂O₂ wurde das Wachstum beider Überexpressionsmutanten sowie des Wildtyps 8/1 und der ΔGpmk1 mit steigender Konzentration reduziert. Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 wurde die Mutante OE_{WT} FGSG_00006 durch 20 mM H₂O₂ etwa 6 % weniger im Wachstum reduziert und zeigte damit eine höhere Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen von H₂O₂. Im Gegensatz dazu führte die Supplementation des Mediums mit H₂O₂ bei der Mutante OE_{ΔG} FGSG_00006 zu einer wesentlich stärkeren Reduktion des Wachstums. Im Vergleich zu den beiden Referenzstämmen Wildtyp 8/1 und ΔGpmk1 war der Koloniedurchmesser der Mutante OE_{ΔG} FGSG_00006 durchschnittlich um 7 % bei 10 mM H₂O₂, 6 % bei 15 mM H₂O₂ und 14 % bei 20 mM H₂O₂ stärker verringert (Abb. 53, Abb. 54, Abb. 55).

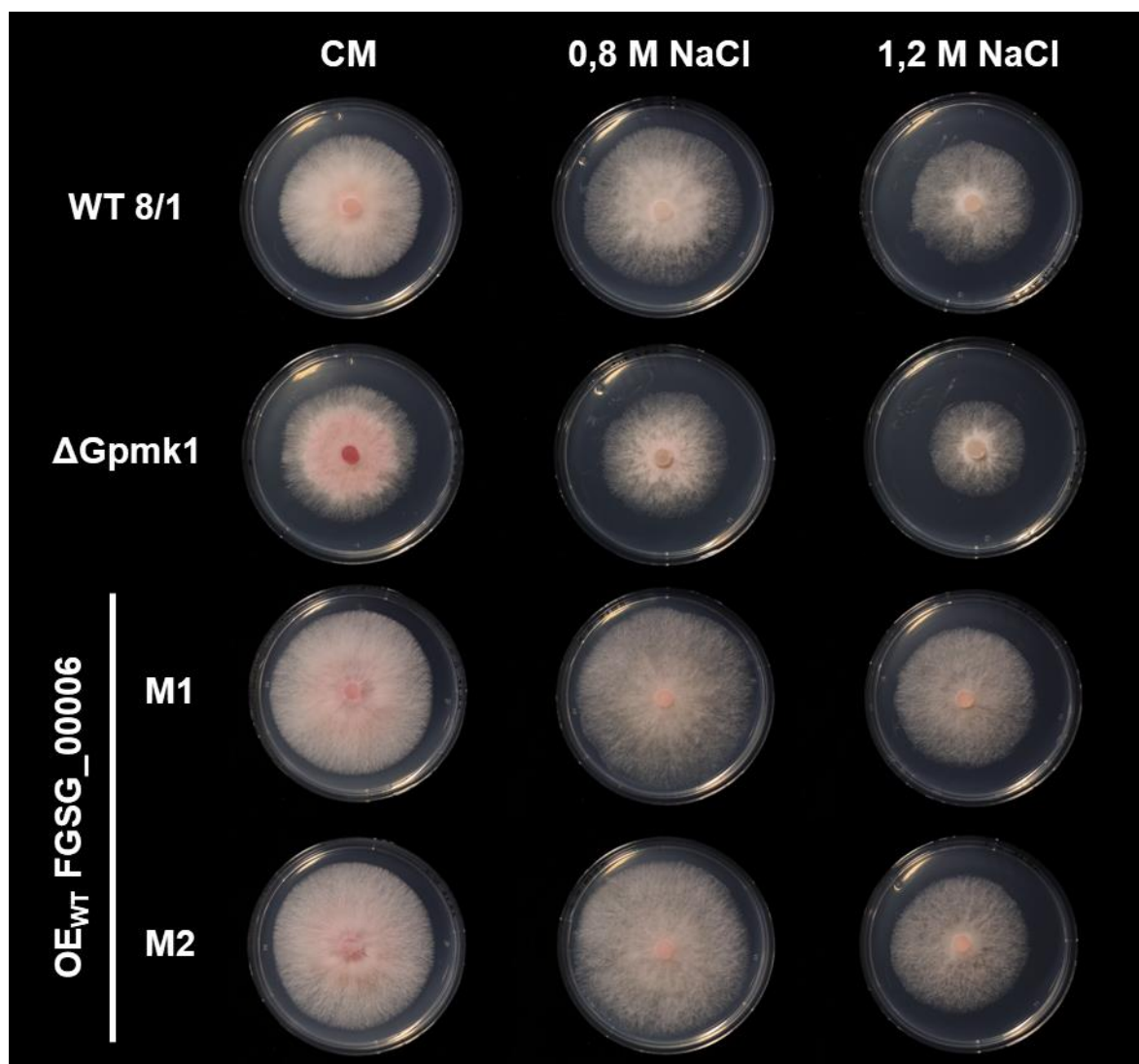


Abb. 50: Wachstum der OE_{WT} FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_00006 (M1 und M2) verwendet.

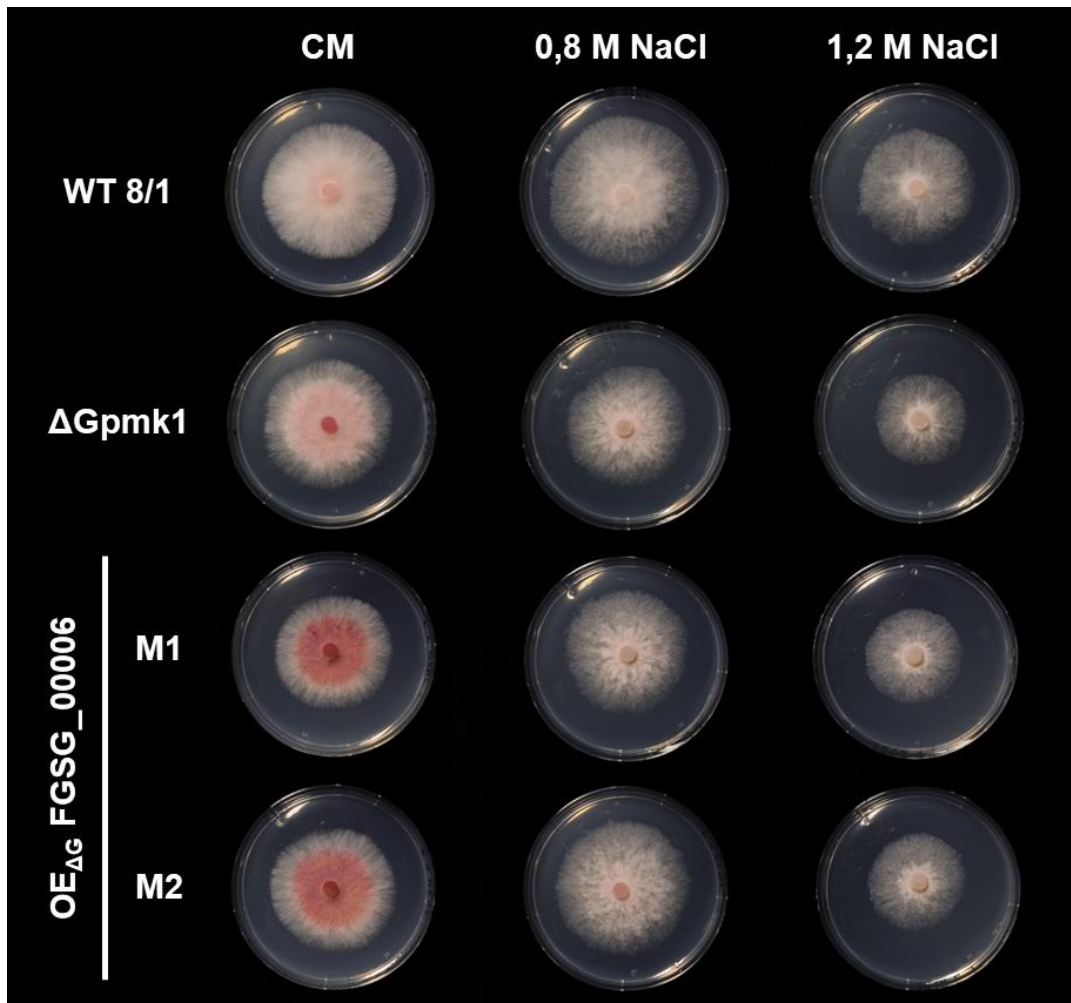


Abb. 51: Wachstum der OE Δ G FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE Δ G FGSG_00006 (M1 und M2) verwendet.

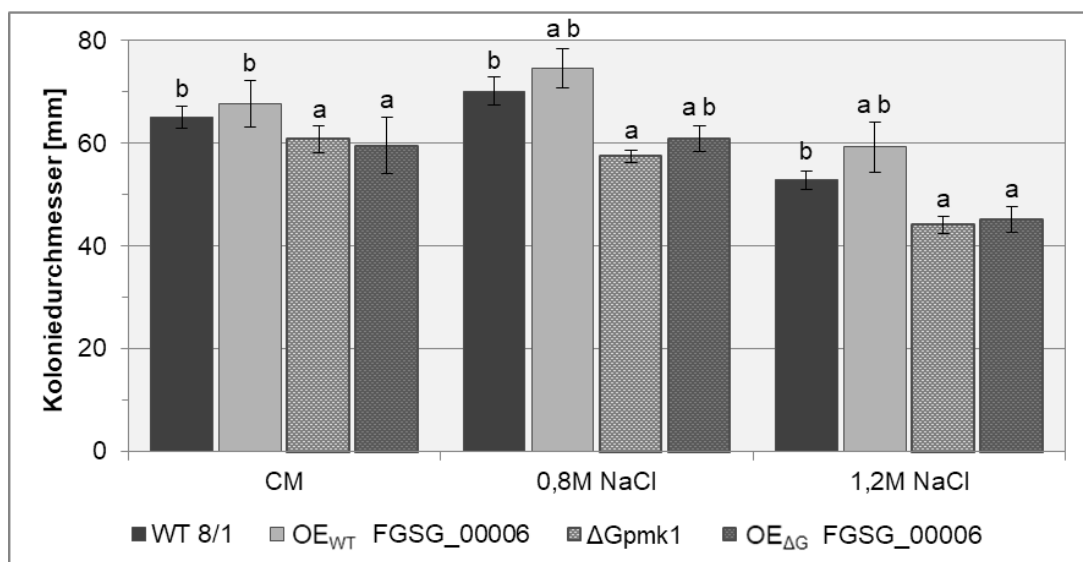


Abb. 52: Wachstum der Mutanten OE_{WT} FGSG_00006 und OE Δ G FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl gemessen (3 dpi). Es wurden jeweils 16 Replikate des Wildtyps 8/1, der Δ Gpmk1 und zwei unabhängiger Mutanten der OE_{WT} FGSG_00006 und der OE Δ G FGSG_00006 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. Δ Gpmk1. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

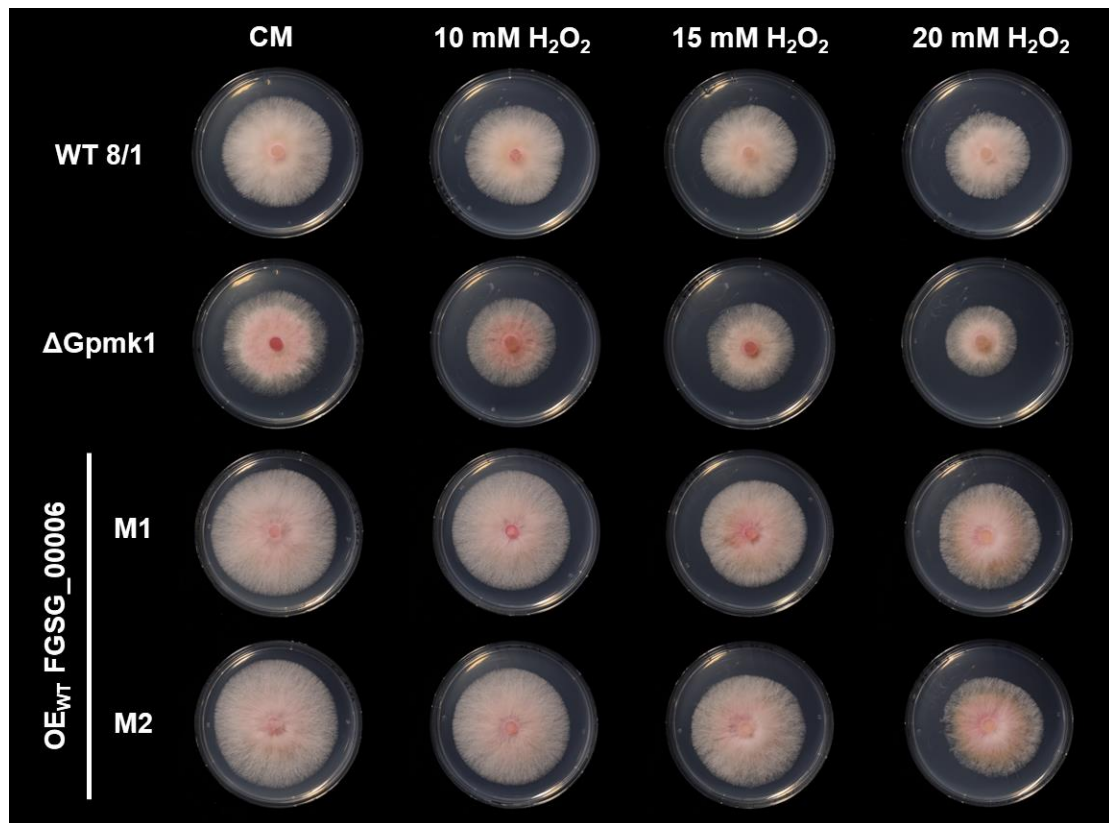


Abb. 53: Wachstum der OE_{WT} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_00006 (M1 und M2) verwendet.

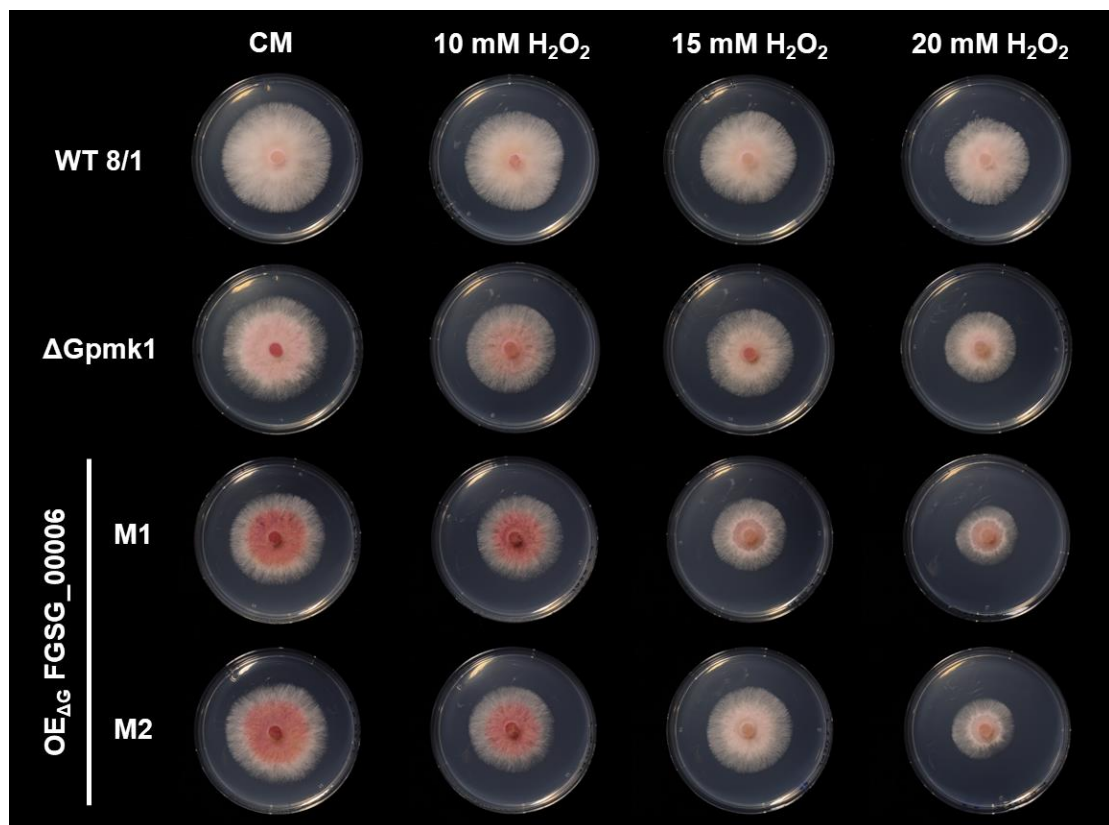


Abb. 54: Wachstum der OE_{ΔG} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_00006 (M1 und M2) verwendet.

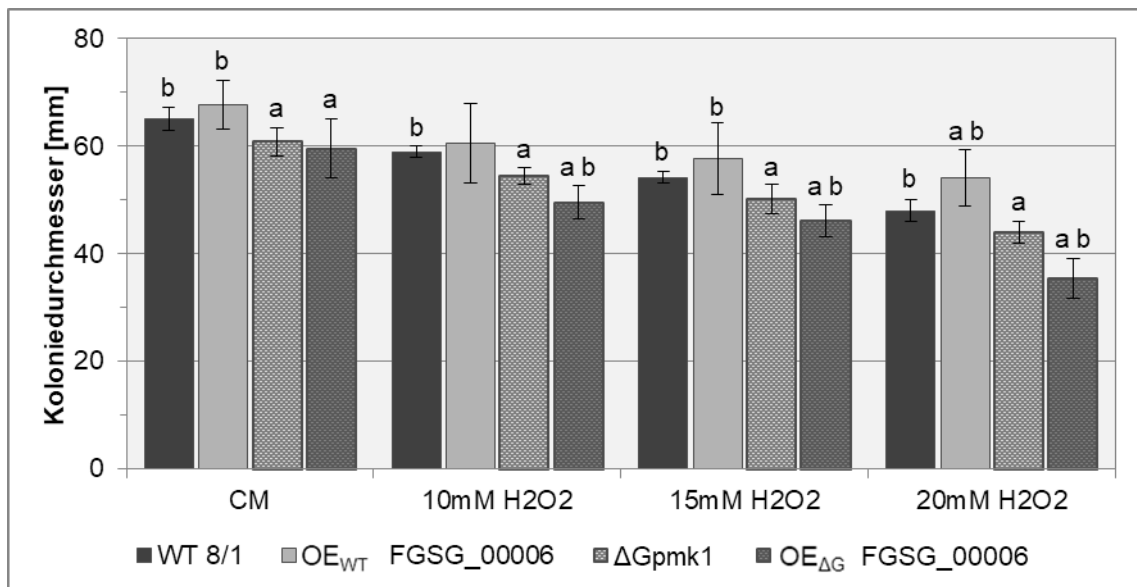


Abb. 55: Wachstum der Mutanten OE_{WT} FGSG_00006 und OE_{ΔG} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden jeweils 16 Replikate des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1 und zwei unabhängiger Mutanten der OE_{WT} FGSG_00006 und der OE_{ΔG} FGSG_00006 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. ΔGpmk1. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

3.4.1.2.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der OE_{WT} FGSG_00006 und OE_{ΔG} FGSG_00006

Zur Untersuchung des allgemeinen Oxidationszustands der Überexpressionsmutanten des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 während des Wachstums auf CM-Festmedium wurde eine Detektion von ROS mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) durchgeführt. Durch das NBT wird Superoxid (O₂⁻) konzentrationsabhängig blau angefärbt (2.2.19).

Sowohl der Wildtyp 8/1 als auch die ΔGpmk1 zeigten beide einen dunklen, blau gefärbten Ring am Rand der gewachsenen Kolonie. Das Myzel war generell leicht blau angefärbt. Diese Färbung war im Zentrum der Kolonie der ΔGpmk1 stärker. Die rote Färbung war der natürliche durch *F. graminearum* synthetisierte Farbstoff Aurofusarin und stand nicht in Verbindung mit ROS oder der NBT-Färbung (Abb. 56).

Bei den Kolonien der Überexpressionsmutante im Wildtyp 8/1 OE_{WT} FGSG_00006 konnte kein stark angefärbter äußerer Ring beobachtet werden. Der Oxidationszustand in dem neu gebildeten Myzel war demnach geringer als beim Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1. Das restliche Erscheinungsbild glich dem des Transformationshintergrunds Wildtyp 8/1 (Abb. 56).

Die Überexpression des Gens mit der ΔGpmk1 als Hintergrund der Mutante OE_{ΔG} FGSG_00006 zeigte keinen Unterschied in der Färbung mit NBT in Relation zur ΔGpmk1. Die Mutation hat also keinen Einfluss auf den Oxidationsgrad der OE_{ΔG} FGSG_00006 (Abb. 56).

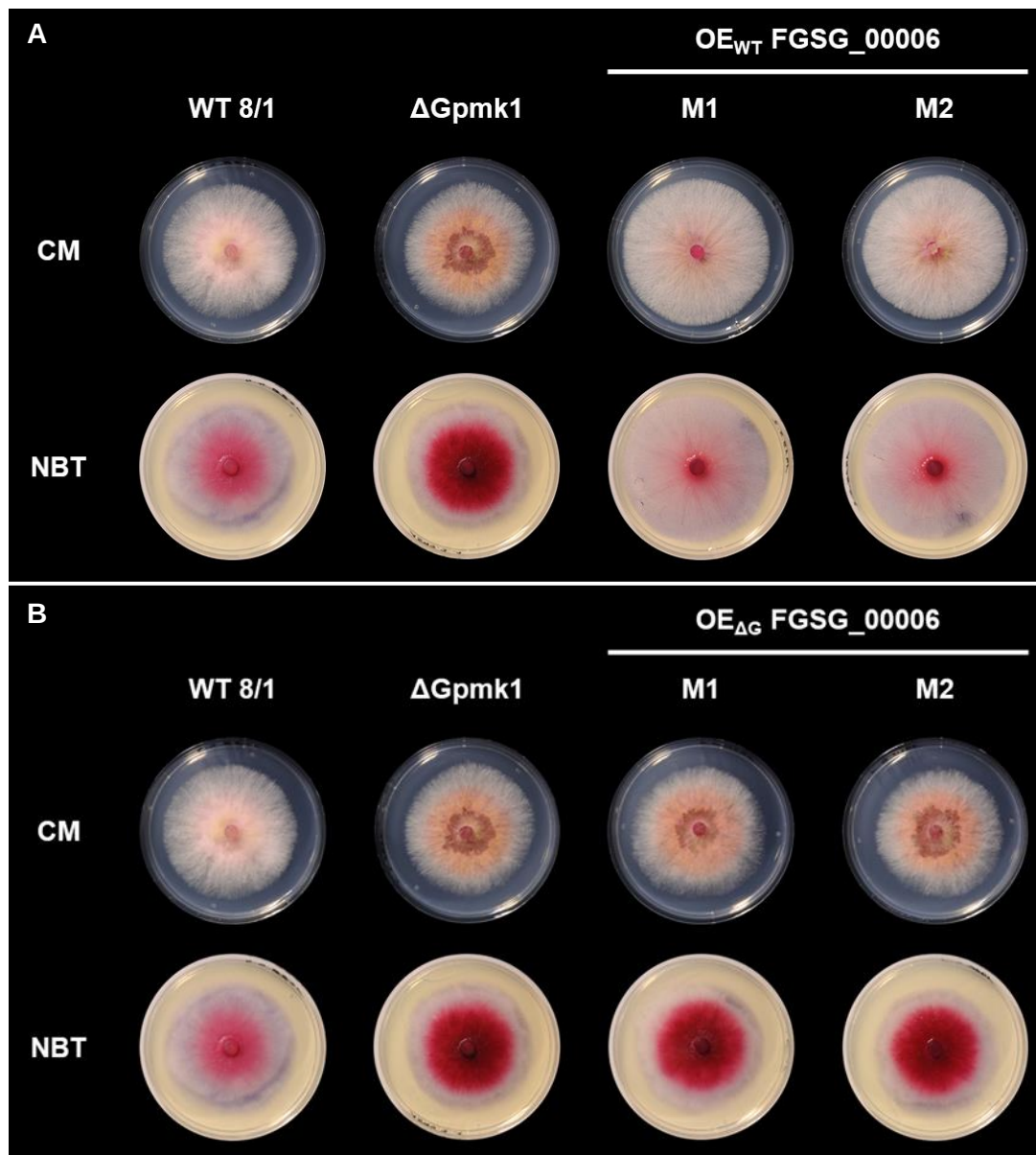


Abb. 56: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beim Wachstum der $OE_{WT} FGSG_00006$ und $OE_{\Delta G} FGSG_00006$ mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Der Oxidationszustand des Pilzes wurde nach Wachstum auf CM-Festmedium (3 dpi) durch Färbung mit NBT untersucht. Es wurden jeweils drei biologische Replikate des Wildtyps 8/1, der $\Delta Gpmk1$ und jeweils zwei unabhängiger Mutanten der $OE_{WT} FGSG_00006$ (**A**) und der $OE_{\Delta G} FGSG_00006$ (**B**) verwendet. CM: Unbehandelte Kolonie, NBT: Gefärbte Kolonie (dunkelblaue Färbung).

3.4.1.2.6 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Infektion von Weizenpaleae durch die OE_{WT} FGSG_00006

Für eine erfolgreiche Infektion von Weizen durch *F. graminearum* ist die Bildung von spezialisierten Strukturen auf der Oberfläche der Pflanze unabdingbar. Da die Überexpressionsmutante des Gens FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 bereits auf dem Weizenkultivar 'Nandu' stark in der Pathogenität eingeschränkt war (3.4.1.2.2), wurde untersucht, ob die Mutante noch die Fähigkeit zur Formierung von Infektionsstrukturen besitzt. Hierfür wurden Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu' mit dem Wildtyp 8/1 und der OE_{WT} FGSG_00006 inokuliert, nach sieben Tagen mit dem Farbstoff WGA-CF™488A angefärbt und mittels CLSM fluoreszenzmikroskopisch untersucht (2.2.21).

Der Wildtyp 8/1 formte auf der Oberfläche der Palea ein weitreichendes Netzwerk aus Laufhyphen, in welchem vereinzelt Infektionskissen und Ansammlungen verschiedener Infektionsstrukturen gebildet wurden (Abb. 57). Die Infektionskissen hatten einen Durchmesser von etwa 20 µm und waren Ursprung mehrerer in das Pflanzengewebe wachsender Hyphen (Abb. 57C-F). Die vereinzelt auftretenden Aggregationen aus verschiedenen Infektionsstrukturen, wie gelappten Appressorien und Infektionskissen, hatten etwa eine Breite von 100 bis 200 µm (Abb. 57A-B).

Die Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_00006 bildete hingegen ausschließlich ein teils stark verzweigtes Netzwerk aus Laufhyphen. Obwohl sich die Hyphen an einigen Stellen mehrfach überkreuzten, wurden keine Infektionsstrukturen gebildet (Abb. 58).

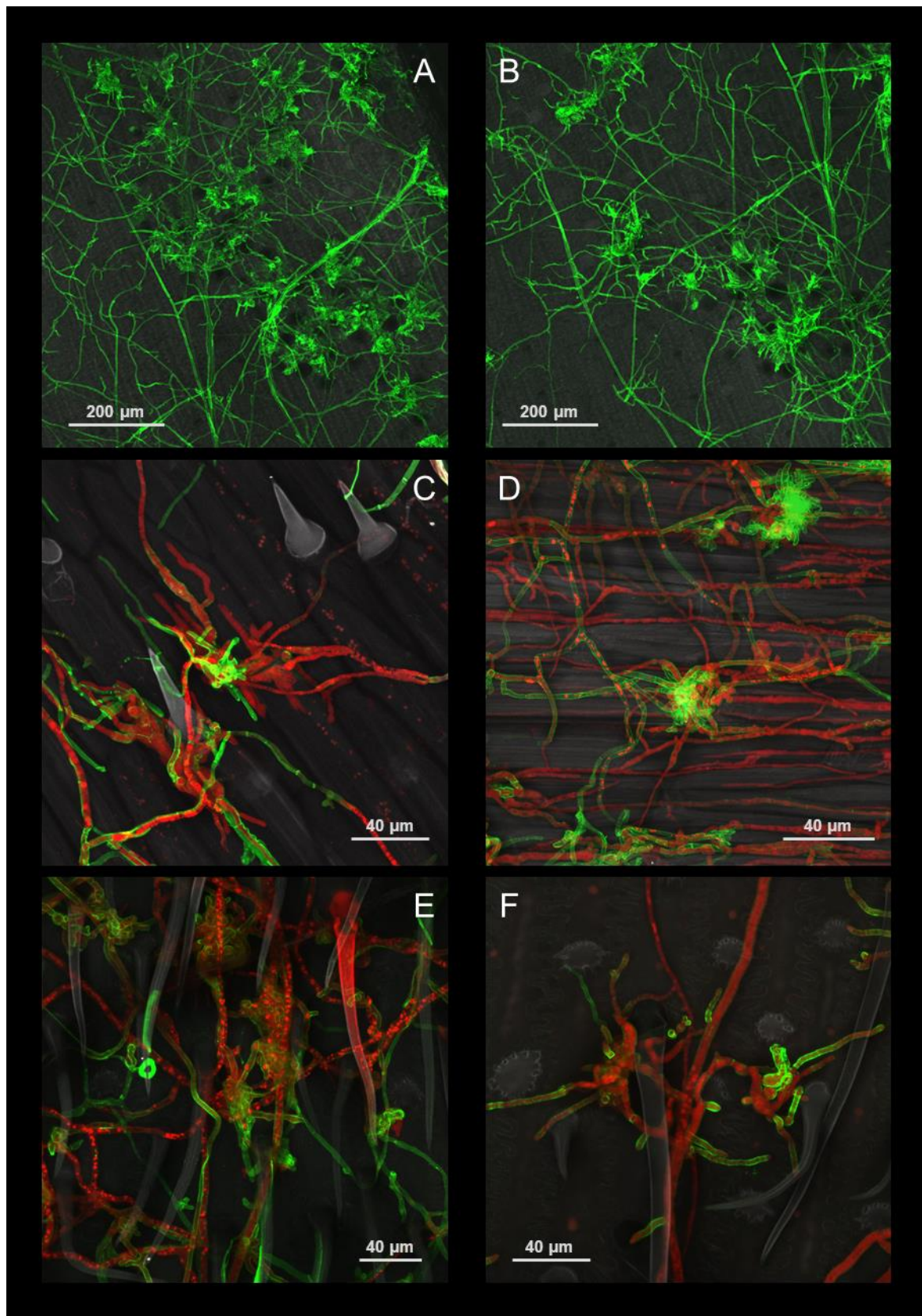


Abb. 57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch den Wildtyp 8/1 (7 dpi). Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der Oberfläche von Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu'. **A+B:** Übersichtsaufnahme des Laufhyphennetzwerks und gebildeter Infektionsstrukturen. **C-F:** Infektionskissen von *F. graminearum*. Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz des mit WGA-CFTM488A gefärbten Chitins (grün), Fluoreszenz eines konstitutiv und zytoplasmatisch exprimierten DsRed (rot). Maßstab: 200 µm bzw. 40 µm.

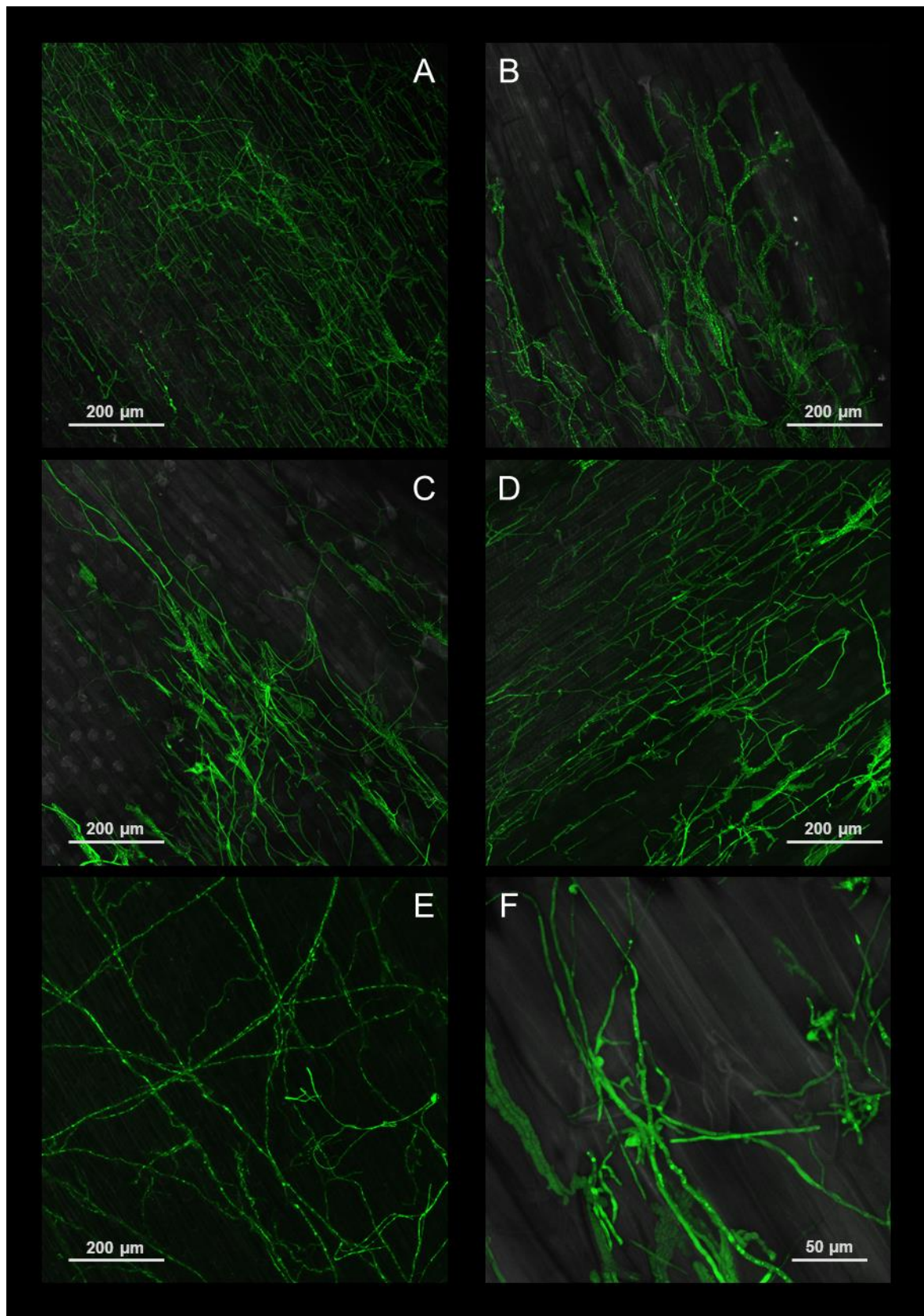


Abb. 58: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch die OE_{WT} FGSG_00006 (7 dpi). Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der Oberfläche von Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu'. **A-E:** Dichtes Laufhyphennetzwerk der OE_{WT} FGSG_00006 ohne erkennbare Infektionsstrukturen. **F:** Fokus auf mehrfach überkreuzt gewachsene Laufhyphen ohne Induktion der Entwicklung eines Infektionskissens. Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz des mit WGA-CFTM488A gefärbten Chitins (grün). Maßstab: 200 μm bzw. 50 μm.

3.4.2 Die Regulatoren der Trichothecen-Biosynthese TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538)

3.4.2.1 Charakterisierung der Überexpressionsmutanten in der Δ Gpmk1

3.4.2.1.1 Überexpression des TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538) in der Δ Gpmk1

Die Überexpression der Gene FGSG_03538 und FGSG_16251 in der Δ Gpmk1 wurde durch Integration eines Überexpressionsvektors, in welchem das jeweilige Gen durch den in *F. graminearum* konstitutiv exprimierenden Promotor *gpdA* aus *A. nidulans* reguliert wird, erreicht. Zur Konstruktion dieser Vektoren wurde das entsprechende Gen mittels PCR aus dem Genom des *F. graminearum* Wildtyps 8/1 mit den Primerpaaren „03538_ApaI_for“ und „03538_NotI_rev“ bzw. „16251_ApaI_for“ und „16251_NotI_rev“ amplifiziert (2.2.1.1). Durch diese Oligonukleotide mit jeweils einer Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease wurde eine gerichtete Ligation in den Überexpressionsvektor „pAN1.7_GluA“ vorbereitet. Die Produkte der PCR wurden jeweils in den Vektor „pJET1.2/blunt“ ligiert (2.2.4) und über *E. coli* vervielfältigt (2.2.5, 2.2.6). Diese Vektoren wurden zur Isolation des Gens FGSG_03538 bzw. FGSG_16251 mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *NotI* geschnitten (2.2.8). Die so erhaltenen Fragmente wurden über eine Silica-Säule aufgereinigt (2.2.3) und in jeweils einen linearisierten „pAN7.1_GluA“ ligiert (2.2.4). Die Linearisierung des Vektors erfolgte zuvor ebenfalls mit den Endonukleasen *ApaI* und *NotI* (2.2.8). Die durch diesen Prozess erstellten Überexpressionsvektoren wurden als „pOE03538“ und „pOE16251“ bezeichnet (Anhang B). Die Vektoren wurden durch *E. coli* amplifiziert (2.2.5, 2.2.6), zur Kontrolle der Integration sequenziert (2.2.7) und für die Transformation von *F. graminearum* mit der Restriktionsendonuklease *AhdI* linearisiert (2.2.8). Für die zwei Transformationen der Δ Gpmk1 wurden jeweils 7 μ g dieses Ansatzes eingesetzt (2.2.12).

Die erhaltenen Transformanten wurden in beiden Fällen auf CM-Festmedium mit dem Antibiotikum Hygromycin B in einer Konzentration von 100 μ l pro ml selektiert (2.2.13). Nach einer erfolgreichen Konidienvereinzelung (2.2.12) wurden für beide putativen Überexpressionsstämme drei unabhängige Transformanten ausgewählt und zur Analyse mittels qRT-PCR verwendet (2.2.1.3). Die hierfür als Vorlage benötigte cDNA wurde mit RNA, welche aus einer drei Tage gewachsenen Myzel-Flüssigkultur isoliert wurde (2.2.13), synthetisiert (2.2.1.2). Das in der qRT-PCR amplifizierte Gen-interne Fragment des FGSG_03538 hatte eine Größe von 166 bp (Primer: „03538_qPCR_for“ und „03538_qPCR_rev“), das Fragment des FGSG_16251 eine Länge von 172 bp (Primer: „16251_qPCR_for“ und „16251_qPCR_rev“).

Im so erstellten Transkriptionsprofil der beiden Gene in den ausgewählten Transformanten war ersichtlich, dass alle getesteten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 eine signifikant gesteigerte Transkription des jeweiligen Gens aufweisen (Abb. 59).

Die drei Mutanten M1, M2 und M3 der Überexpression des Gens FGSG_03538 hatten eine um etwa 1900-, 2300- und 2100-fach verstärkte Transkription des Gens (Abb. 59A). Bei den Mutanten M1, M2 und M3 der Überexpression des Gens FGSG_16251 lag der Faktor der Erhöhung der Transkription bei etwa 6300, 7300 bzw. 3000 (Abb. 59B).

Zusammenfassend konnten jeweils drei Überexpressionsmutanten für die Gene FGSG_03538 und FGSG_16251 in der Δ Gpmk1 erstellt und identifiziert werden. Diese werden in der folgenden Charakterisierung zusammenfassend als OE Δ G FGSG_03538 und OE Δ G FGSG_16251 bezeichnet. Wird eine individuelle Betrachtung der Mutanten durchgeführt, wird die Benennung der Mutanten mit M1, M2 und M3 beibehalten.

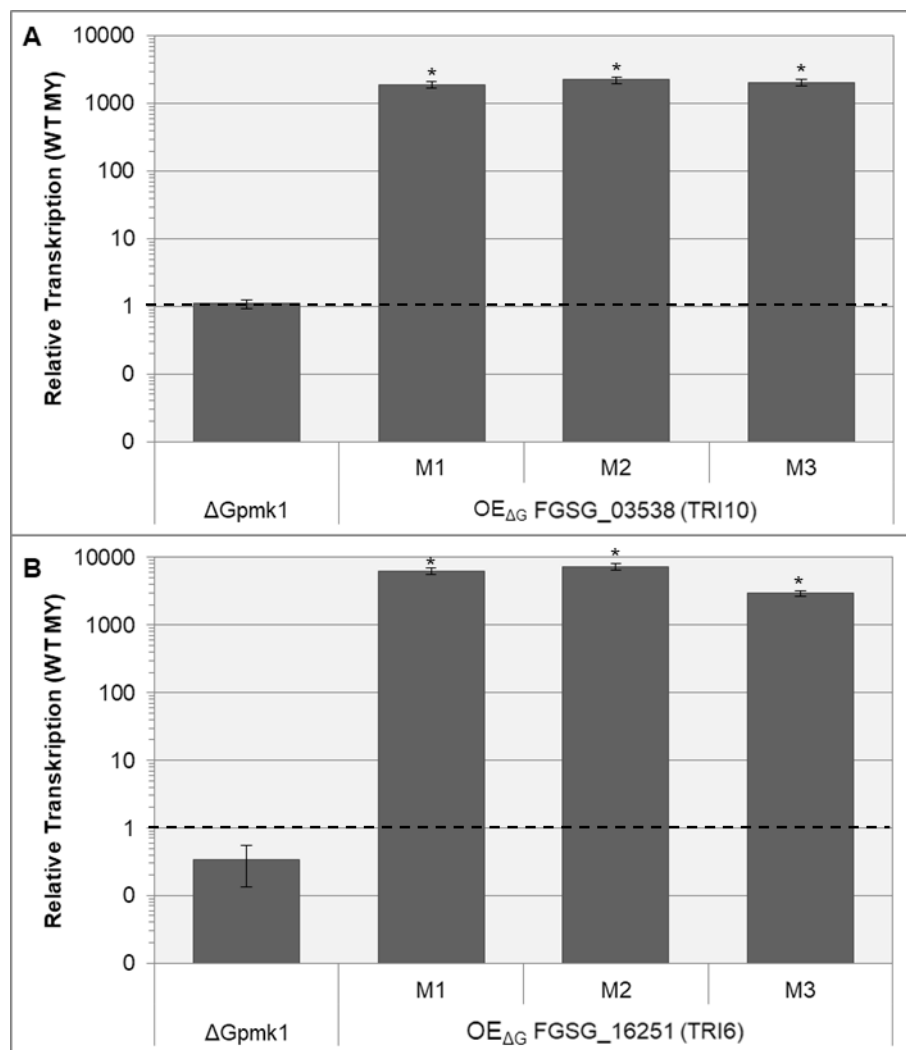


Abb. 59: Transkriptionsprofil der Gene FGSG_03538 (TRI10) und FGSG_16251 (TRI6) in verschiedenen Mutanten in Relation zum Wildtyp 8/1. Die relative Transkription des FGSG_03538 (**A**) und des FGSG_16251 (**B**) der Δ Gpmk1 und jeweils drei unabhängiger Überexpressionsmutanten (M1 bis M3) von OE Δ G FGSG_03538 und OE Δ G FGSG_16251 im Vergleich zum Myzel des Wildtyps 8/1 (WT MY). Das Transkriptionsniveau des Wildtyps 8/1 wurde auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde cDNA aus dem jeweiligen Myzel verwendet (3 dpi). Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^*=0,00083$.

3.4.2.1.2 Infektionsstudie mit der OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 auf Weizen

Um den Effekt der Überexpression der Gene FGSG_03538 und FGSG_16251 in der Δ Gpmk1 zu untersuchen, wurde eine Infektionsstudie auf dem *F. graminearum*-anfälligen Weizenkultivar 'Nandu' durchgeführt. Die Ähren wurden 21 Tage nach der Inokulation mit der jeweiligen Mutante und den Referenzstämmen dokumentiert (2.2.17.1).

Die Infektion der Mutante OE_{ΔG} FGSG_03538 verlief identisch zur Δ Gpmk1. Nur an den Paleae und Lemmae der inokulierten Ährchen konnten Nekrosen beobachtet werden (Abb. 60).

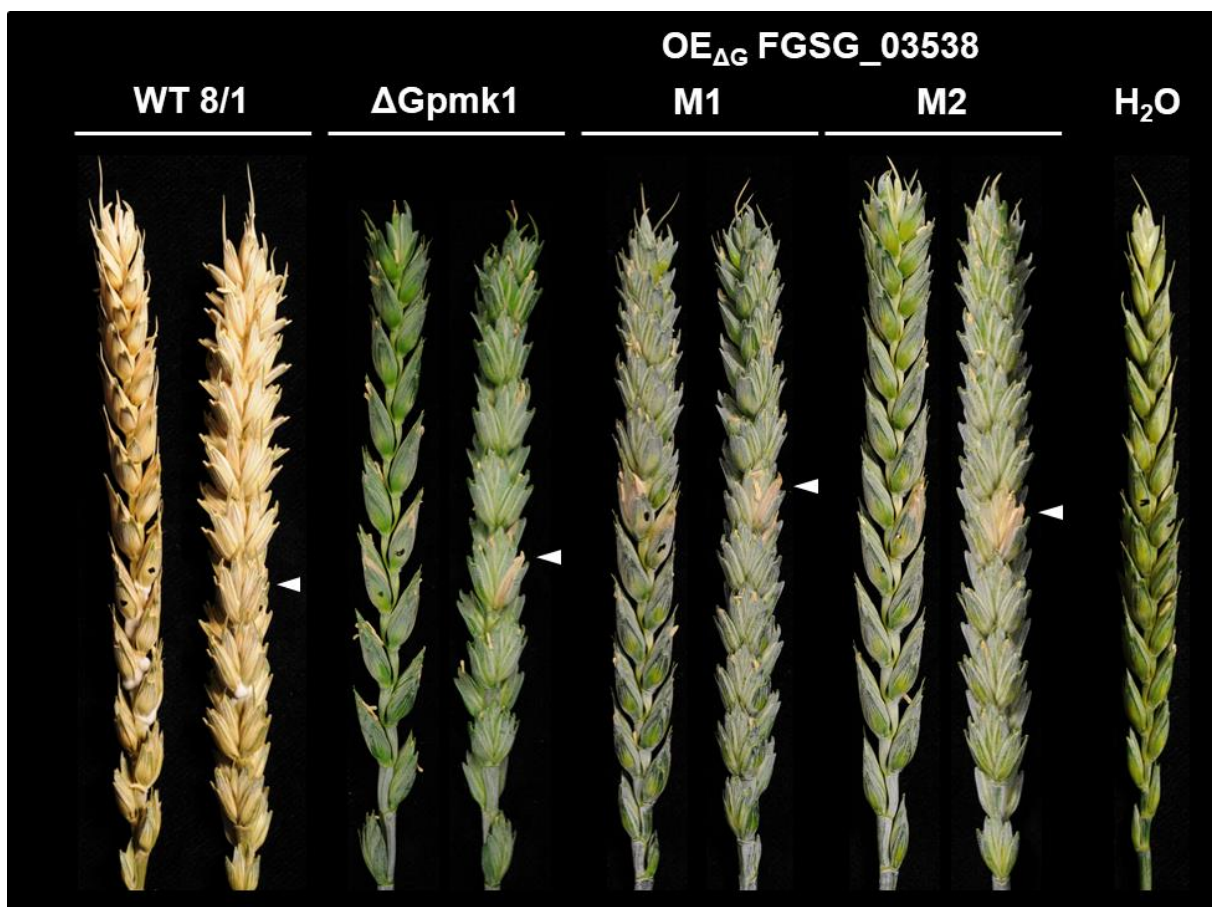


Abb. 60: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE_{ΔG} FGSG_03538 (TRI10). Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu') durch den Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und durch zwei unabhängige Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_03538 (M1 und M2), jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 21 unabhängige Replikate ausgewertet.

Die Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 zeigt im Vergleich zur Δ Gpmk1 eine signifikant gesteigerte Pathogenität. Die Infektion reicht deutlich über das inokulierte Ährchen hinaus und beläuft sich auf etwa 62 % der Ähre. Im Vergleich zur Δ Gpmk1 ist dies eine Steigerung von etwa 61 %. Das Infektionspotential ist allerdings geringer als das des Wildtyps 8/1, der die gesamte Ähre infiziert (Abb. 61, Abb. 62).

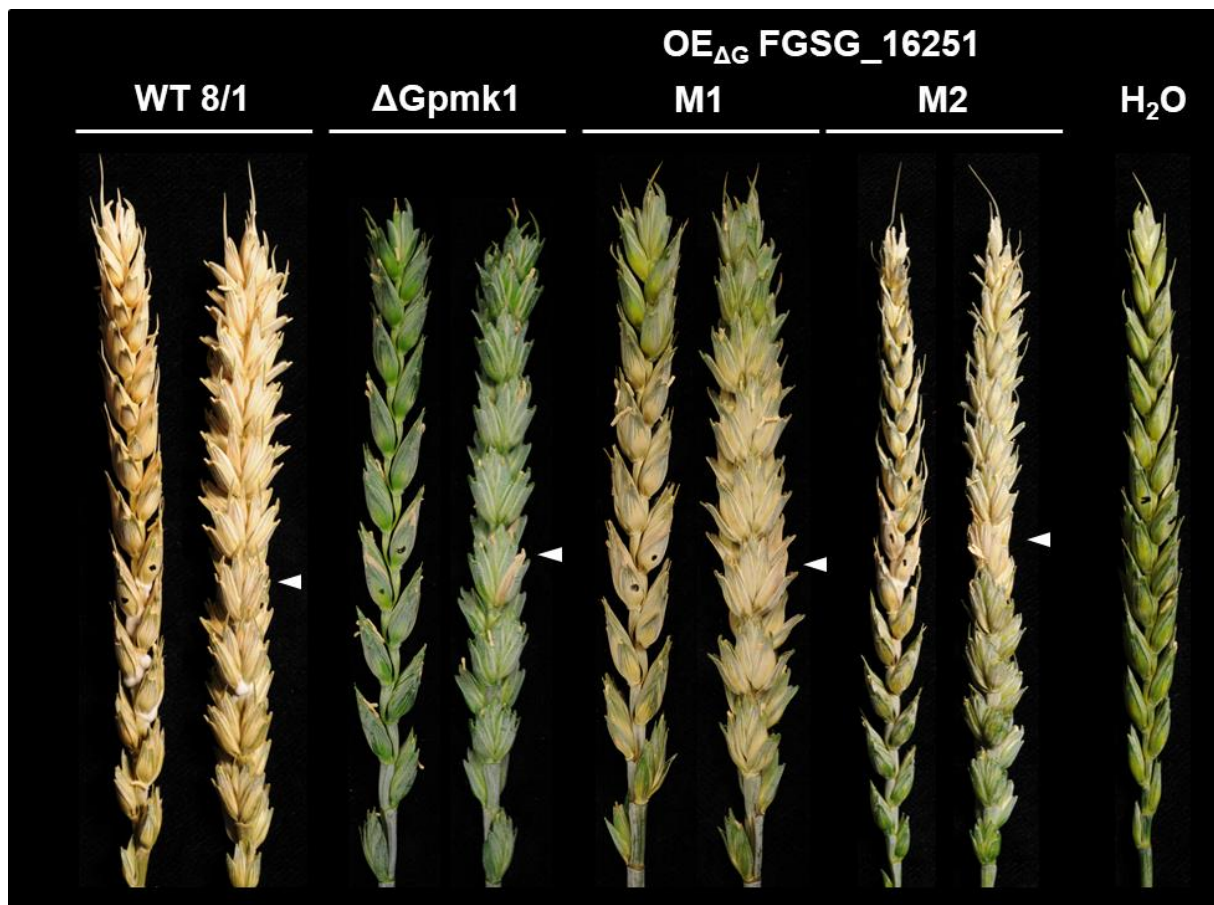


Abb. 61: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE_{ΔG} FGSG_16251 (TRI6). Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu') durch den Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und durch zwei unabhängige Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_16251 (M1 und M2), jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 21 unabhängige Replikate ausgewertet.

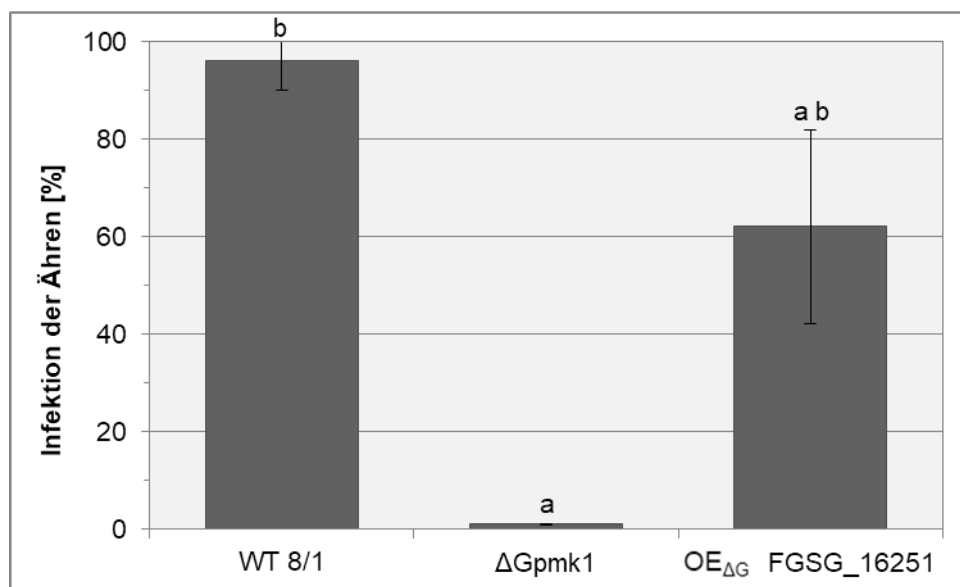


Abb. 62: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Nandu' mit der Überexpressionsmutante OE_{ΔG} FGSG_16251 (TRI6). Relative Infektion einer Ähre (21 dpi) durch den Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und die OE_{ΔG} FGSG_16251. Es wurden jeweils 21 unabhängige Replikate ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. ΔGpmk1. $p^{a,b} \leq 0,0016$.

3.4.2.1.3 Asexuelle Reproduktion der OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251

Die Fähigkeit zur asexuellen Reproduktion der Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 wurde durch die Induktion der Konidienproduktion in flüssigem Medium aus Weizenblättern untersucht. Die Konidien wurden sechs Tage nach der Inokulation des Mediums gezählt und in Relation zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 betrachtet (2.2.13).

Der Wildtyp 8/1 produzierte in diesem Zeitraum etwa 64 Konidien pro μl . Die ΔGpmk1 und die Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 haben mit durchschnittlich etwa 119 Konidien pro μl gleich viele Konidien gebildet. Die Überexpression der Gene FGSG_03538 und FGSG_16251 verursacht demnach keinen Unterschied in der asexuellen Reproduktion im Vergleich zum Hintergrundstamm ΔGpmk1 (Abb. 63).

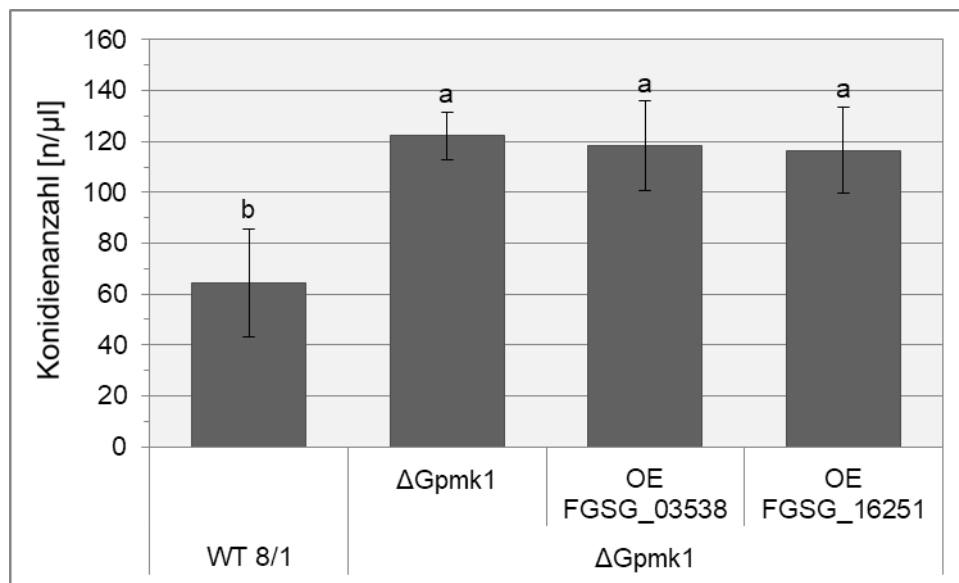


Abb. 63: Asexuelle Reproduktion der Überexpressionsmutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 (TRI10) und OE_{ΔG} FGSG_16251 (TRI6) in flüssigem Weizenmedium. Die Produktion von Konidien des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1, der OE_{ΔG} FGSG_03538 und der OE_{ΔG} FGSG_16251 wurde durch Zählung der gebildeten Konidien (6 dpi) untersucht. Es wurden drei biologische Replikate von drei unabhängigen Überexpressionsmutanten ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. ΔGpmk1. $p^{a,b} \leq 0,000025$.

3.4.2.1.4 Die OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 unter osmotischem und oxidativem Stress

Der Effekt einer Überexpression der Gene FGSG_03538 (TRI10) und FGSG_16251 (TRI6) auf die Reaktion der jeweiligen Mutante auf osmotischen und oxidativen Stress wurde in einer Wachstumsstudie auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von Natriumchlorid (NaCl) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in verschiedenen Konzentrationen betrachtet (2.2.18).

Die Mutante OE_{ΔG} FGSG_03538 zeigte unter allen getesteten Bedingungen ein mit der Ursprungsmutante ΔGpmk1 vergleichbares Wachstum. Die Mutation besitzt demnach keinen Einfluss auf die Reaktion bei einer Zugabe von NaCl oder H₂O₂ (Abb. 64, Abb. 66, Abb. 67, Abb. 69).

Das Wachstum der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 war im Vergleich zur ΔGpmk1 bereits auf CM-Festmedium ohne die Zugabe eines der Stoffe um etwa 3 % tendenziell leicht reduziert (Abb. 65, Abb. 66).

Bei einer Zugabe von 0,8 M NaCl war das Wachstum der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 um etwa 2 % gesteigert. Dies ist im Vergleich zur ΔGpmk1 eine Steigerung des Wachstums um etwa 7 % und somit eine vollständige Kompensation des durch diese Konzentration an NaCl reduzierten Wachstums der Hintergrundmutante (Abb. 65, Abb. 66).

Bei einem Zusatz von 1,2 M NaCl zu dem Testmedium zeigte die Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 wie der Wildtyp 8/1 und die ΔGpmk1 ein reduziertes Wachstum. Die Mutante weist jedoch eine erhöhte Toleranz gegenüber osmotischem Stress auf, welche im Vergleich zur ΔGpmk1 zu einem um etwa 5 % weniger verringerten Koloniedurchmesser führte (Abb. 65, Abb. 66).

Oxidativer Stress durch H₂O₂ führte bei der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 zu einer Reduktion des Wachstums. Insbesondere der Koloniedurchmesser bei einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ zum Medium wurde stark um etwa 19 % inhibiert. Dies ist im Vergleich zur ΔGpmk1 eine um 9 % gesteigerte Sensibilität gegenüber dieser Konzentration von H₂O₂. Bei höheren Mengen von H₂O₂ war die Verringerung des Wachstums der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 mit 17 % bei 15 mM H₂O₂ bzw. etwa 26 % bei 20 mM H₂O₂ hingegen mit dem Transformationshintergrund ΔGpmk1 vergleichbar (Abb. 68, Abb. 69).

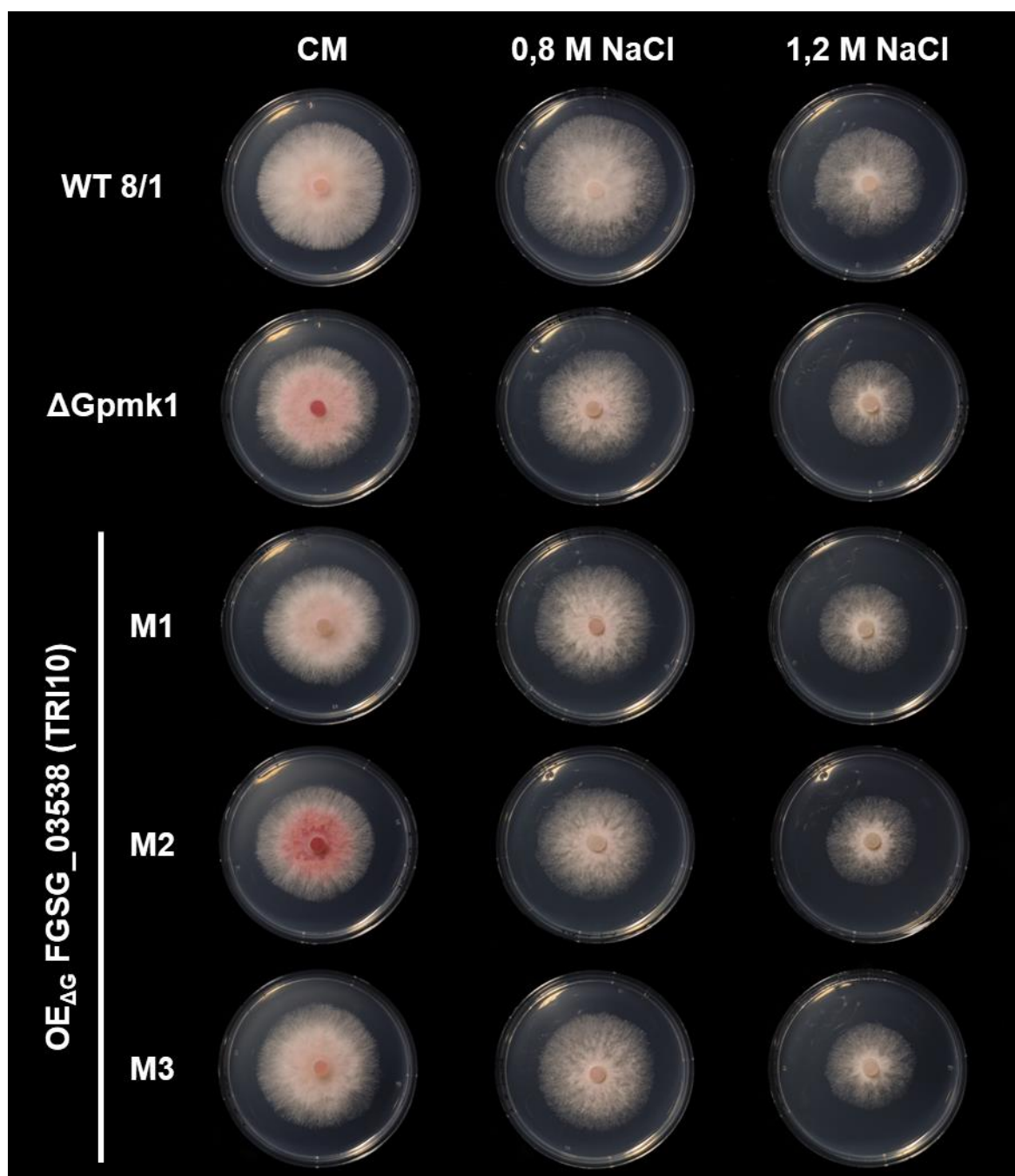


Abb. 64: Wachstum der OE Δ G FGSG_03538 unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und drei unabhängige Mutanten der OE Δ G FGSG_03538 (M1 bis M3) verwendet.

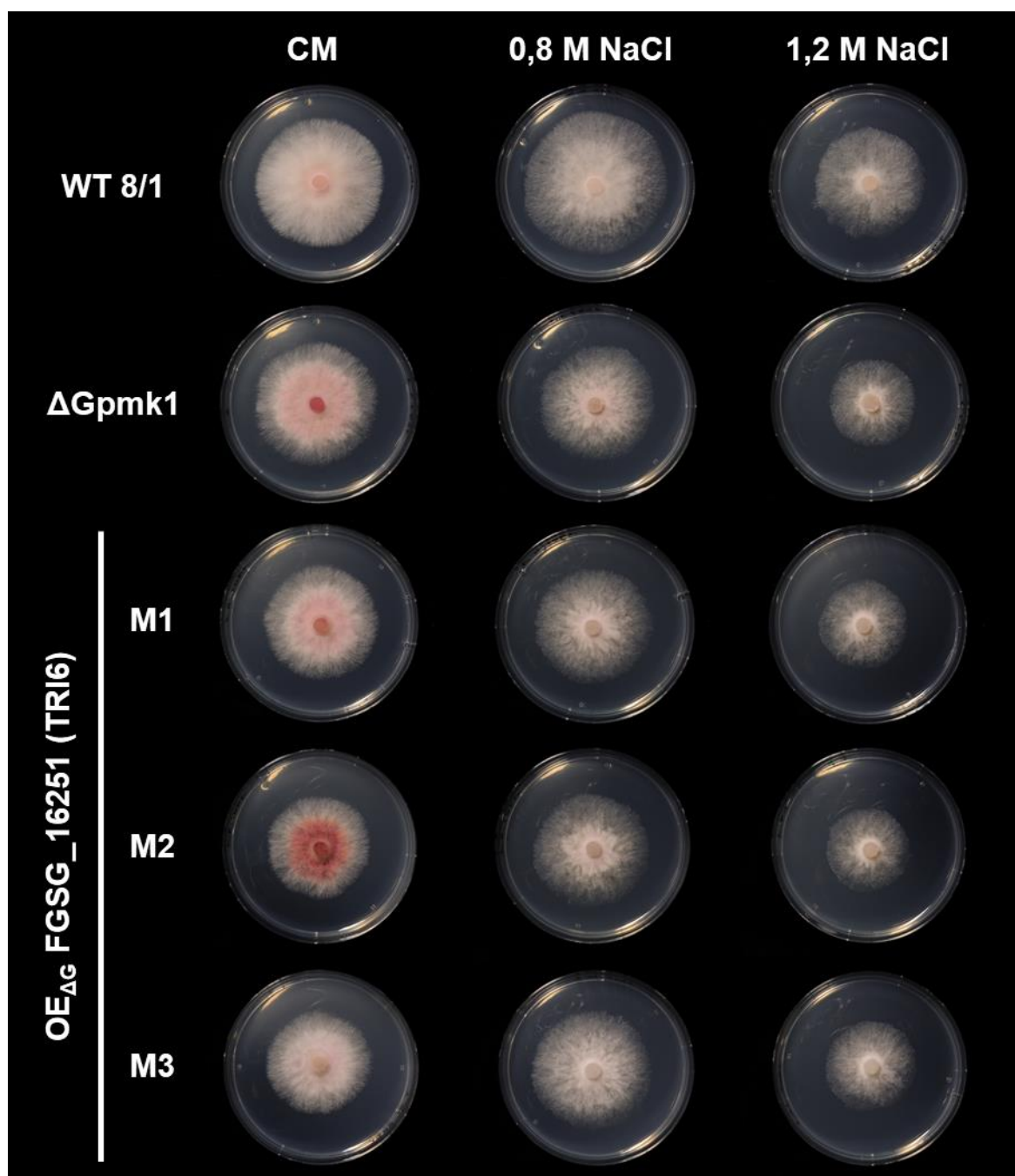


Abb. 65: Wachstum der OE_{ΔG} FGSG_16251 unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und drei unabhängige Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_16251 (M1 bis M3) verwendet.

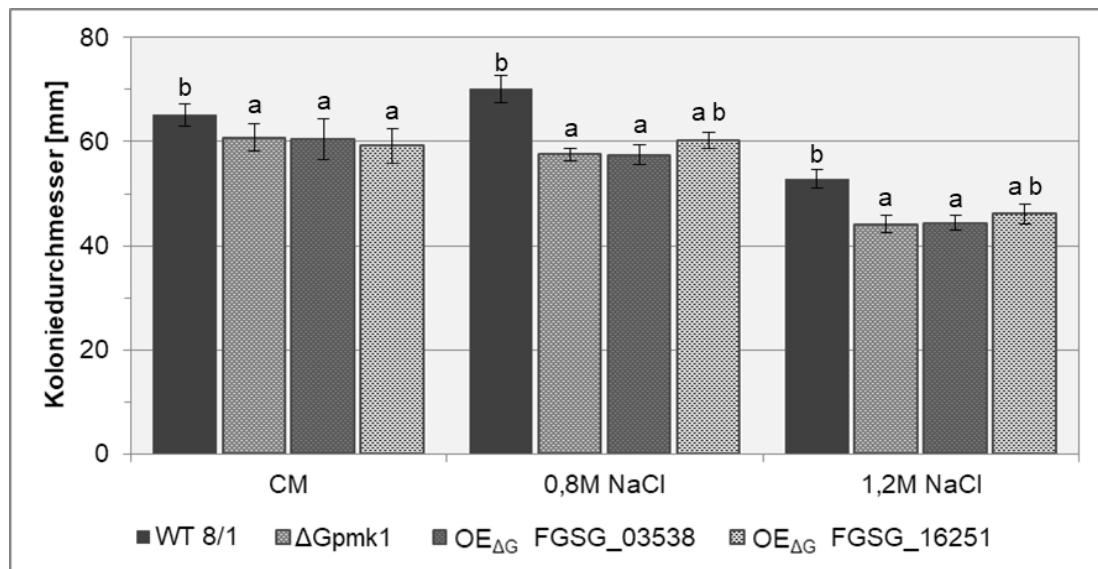


Abb. 66: Wachstum der Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 (TRI10) und OE_{ΔG} FGSG_16251 (TRI6) unter hyperosmotischen Bedingungen. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl gemessen (3 dpi). Es wurden jeweils 24 Replikate des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1 und drei unabhängiger Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_03538 und der OE_{ΔG} FGSG_16251 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz gg. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz gg. ΔGpmk1. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

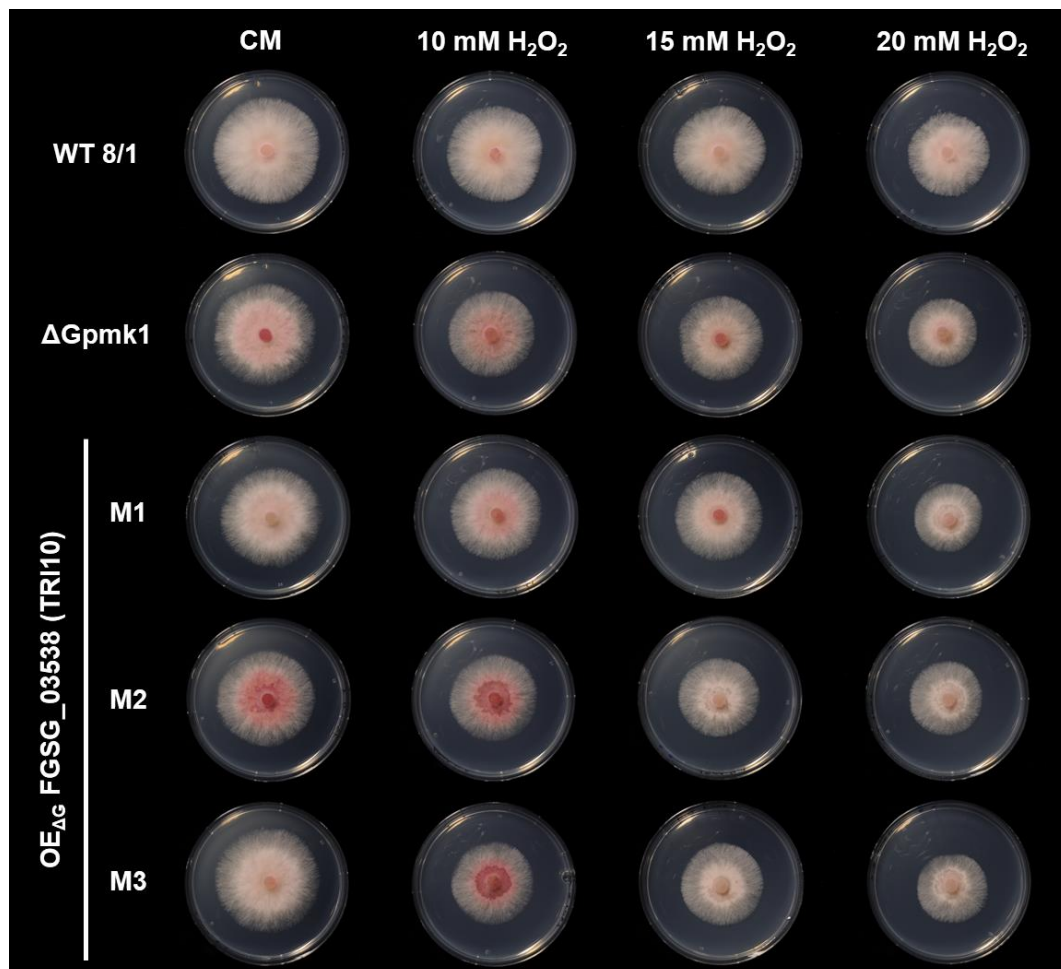


Abb. 67: Wachstum der OE_{ΔG} FGSG_03538 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und drei unabhängige Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_03538 (M1 bis M3) verwendet.

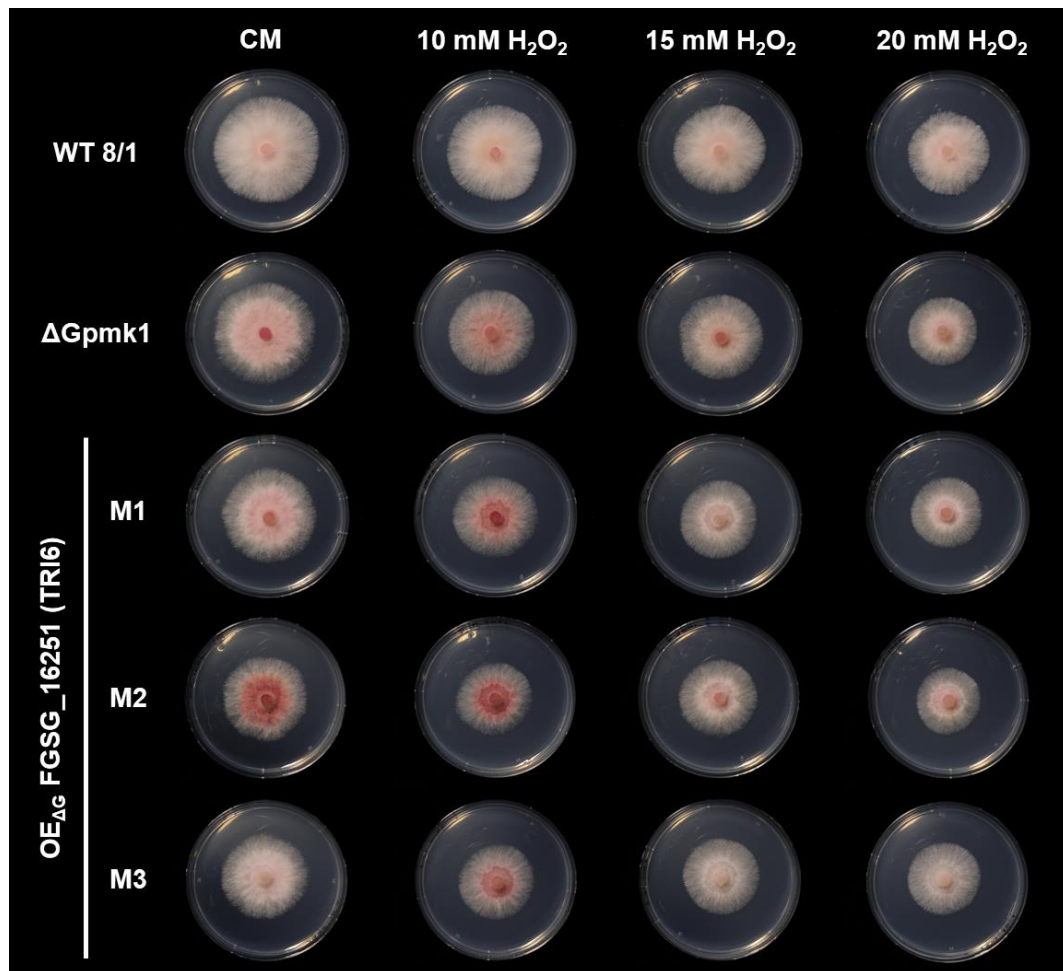


Abb. 68: Wachstum der OE Δ G FGSG_16251 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und drei unabhängige Mutanten der OE Δ G FGSG_16251 (M1 bis M3) verwendet.

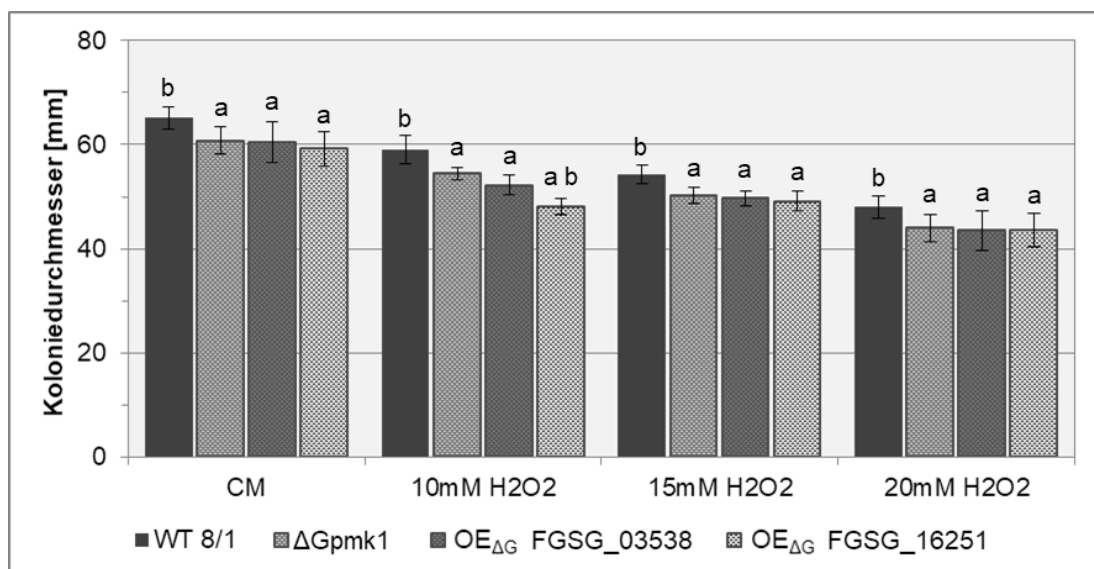


Abb. 69: Wachstum der Mutanten OE Δ G FGSG_03538 (TRI10) und OE Δ G FGSG_16251 (TRI6) unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden jeweils 24 Replikate des Wildtyps 8/1, der Δ Gpmk1 und drei unabhängiger Mutanten der OE Δ G FGSG_03538 und der OE Δ G FGSG_16251 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. Δ Gpmk1. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

3.4.2.1.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251

Der allgemeine Oxidationszustand der Überexpressionsmutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 während des Wachstums auf CM-Festmedium wurde anhand einer Färbung mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) bestimmt. NBT färbt durch Reaktion mit Superoxid (O₂⁻) im Myzel des Pilzes die Hyphen bläulich an. Die Intensität dieser Färbung ist anhängig von dem vorhandenen Superoxid (2.2.19).

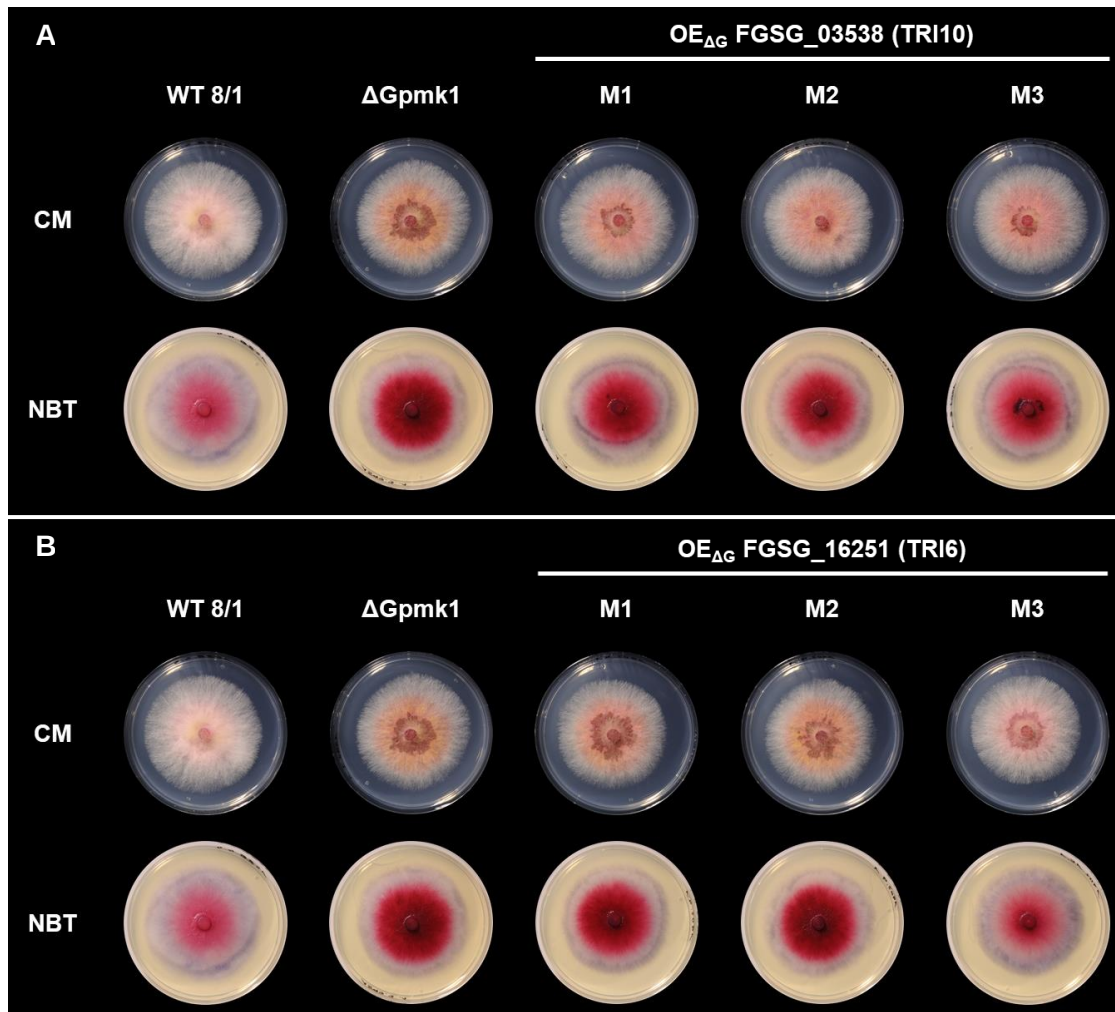


Abb. 70: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beim Wachstum der OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Der Oxidationszustand des Pilzes wurde nach Wachstum auf CM-Festmedium (3 dpi) durch Färbung mit NBT untersucht. Es wurden jeweils drei biologische Replikate des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1 und jeweils drei unabhängiger Mutanten der OE_{ΔG} FGSG_03538 (A) und der OE_{ΔG} FGSG_16251 (B) verwendet. CM: Unbehandelte Kolonie, NBT: Gefärbte Kolonie (dunkelblaue Färbung).

Die Kolonien des Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 zeigten beide einen dunkel gefärbten Ring am Rand der jeweiligen Kolonie. Die gesamte Kolonie der beiden Stämme war leicht blau eingefärbt. Zudem war die Mitte der Kolonie der ΔGpmk1 in einer stärkeren Intensität gefärbt. Die rote Färbung stand nicht im Zusammenhang mit ROS oder dem NBT, da es sich dabei um den natürlich, von *F. graminearum* gebildeten, Farbstoff Aurofusarin handelte (Abb. 70).

Die Mutante OE_{ΔG} FGSG_03538 zeigte einen im Vergleich zur Ursprungsmutante ΔGpmk1 intensiver gefärbten Ring in der Wachstumszone des Pilzes. Dies ließ darauf schließen, dass die jungen Hyphen in diesem Bereich beim Wachstum einer höheren Konzentration an ROS ausgesetzt sind. Die Färbung der übrigen Kolonie war vergleichbar mit der der unveränderten ΔGpmk1 (Abb. 70).

Auch bei der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 war im Vergleich zur ΔGpmk1 ein stärker gefärbter Ring am äußeren Rand der Kolonie zu erkennen. Im Allgemeinen war das Myzel der OE_{ΔG} FGSG_16251 dunkler gefärbt als das der ΔGpmk1. Der Oxidationsgrad der Mutante ist demnach generell und insbesondere in den Randbereichen der Kolonie im Vergleich zur Ursprungsmutante ΔGpmk1 erhöht (Abb. 70).

3.4.2.1.6 Synthese von Deoxynivalenol während der Infektion von Weizen durch die Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251

Die Überexpression der beiden Regulatoren des TRI-Clusters FGSG_03538 (TRI10) und FGSG_16251 (TRI6) in der ΔGpmk1 führte zu der Frage, ob diese Modifikation die Aktivität des Sekundärmetabolit-Clusters während der Infektion von Weizen wiederherstellen könne und somit zu einer erneuten Synthese des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) führe. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die DON-Produktion mit Hilfe eines Enzymimmunoassays quantitativ untersucht (2.2.20). Es wurde ein DON-Extrakt von Ähren des Weizenkultivars 'Nandu' 14 Tage nach der Inokulation mit dem jeweiligen Stamm verwendet. Die bestimmte Menge an DON wurde mittels qRT-PCR in Relation zum Anteil des Pilzmyzels in der Probe gesetzt (2.2.1.3).

Die Untersuchung zeigte, dass der Wildtyp 8/1 während der Infektion etwa 11 µg DON pro µg Myzel produziert. In dem Material der ΔGpmk1 konnte hingegen kein DON detektiert werden (Abb. 71).

Während der Infektion durch die Überexpressionsmutante OE_{ΔG} FGSG_03538 findet wie im Transformationshintergrund ΔGpmk1 keine Synthese des Mykotoxins statt (Abb. 71).

Die Modifikation des Expressionsniveaus des FGSG_16251 in der OE_{ΔG} FGSG_16251 stellt hingegen die Fähigkeit der ΔGpmk1 zur Produktion von DON wieder her. Die gebildete Konzentration liegt mit etwa 5 µg DON pro µg Myzel bei etwa 45 % der vom Wildtyp 8/1 synthetisierten Menge (Abb. 71).

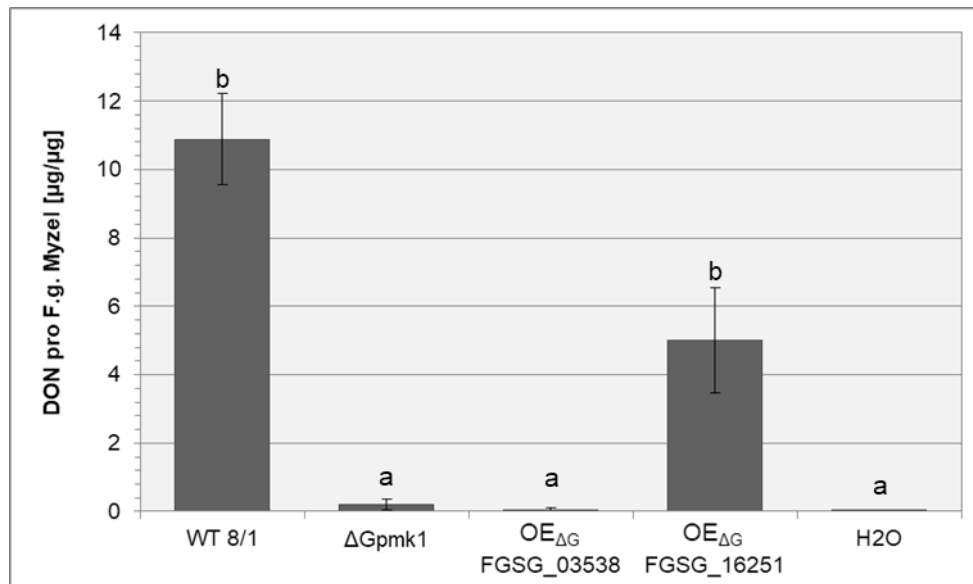


Abb. 71: Anreicherung von Deoxynivalenol (DON) im Pflanzengewebe während der Infektion von Weizen. Die DON-Menge wurde relativ zu dem in der Pflanze gewachsenen Myzel [μg DON pro μg Myzel] gemessen. Es wurden jeweils 5 Ähren (14 dpi) des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1 , der Überexpressionsmutanten $\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ FGSG_03538 ($\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ TRI10) und $\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ FGSG_16251 ($\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ TRI6) sowie der Scheininokulation mit sterilem Wasser (H_2O) verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. ΔGpmk1 . $p^{a,b} \leq 0,001$.

3.4.2.1.7 Transkriptionsprofil des Sekundärmetabolit-Clusters der Deoxynivalenol-Biosynthese in $\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ FGSG_03538 und $\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ FGSG_16251 im Myzel und während der Infektion von Weizen

Die in der ΔGpmk1 überexprimierten Gene FGSG_03538 und FGSG_16251 codieren die Regulator-Proteine TRI6 und TRI10 des Sekundärmetabolit-Clusters der Deoxynivalenol-Biosynthese. Durch diese Überexpression wird die Fähigkeit der ΔGpmk1 , das Mykotoxin DON während der Infektion von Weizen des Kultivars 'Nandu' zu bilden, wiederhergestellt (3.4.2.1.6). Daher wurde der Einfluss der Überexpressionen auf die Regulation der insgesamt 15 Gene des Clusters mittels qRT-PCR untersucht (2.2.1.3). Hierfür wurde cDNA des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1 und der Mutanten $\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ FGSG_03538 und $\text{OE}_{\Delta\text{G}}$ FGSG_16251 verwendet (2.2.13, 0, 2.2.1.1).

So wurden Transkriptionsprofile der Cluster-Gene beim Wachstum in einer axenischen Kultur in CM-Flüssigmedium (2.2.13) und während der frühen Infektionsphase sieben Tage nach der Inokulation von Weizen des Kultivars 'Nandu' (2.2.17.1) erstellt.

Zunächst wurde der grundsätzliche Transkriptionsunterschied der Gene des TRI-Clusters zwischen dem Myzel der axenischen Kultur und Pilzmaterial, welches während der Infektion von Weizen gewachsen ist, betrachtet (Abb. 72). Hierfür wurde die Transkription im Myzel in Relation zu der des pflanzen-induzierten Wildtyps 8/1 gesetzt. Ausschließlich das Gen FGSG_03529 war signifikant und das Gen FGSG_03542 tendenziell in der Myzelkultur verstärkt transkribiert.

Das Gen FGSG_03533 war sowohl auf der Pflanze als auch im Myzel gleichermaßen exprimiert. Die Transkription der übrigen Gene des Clusters war im Myzel insgesamt signifikant geringer (Abb. 72). Die Transkription der Gene des TRI-Clusters ist demnach zum größten Teil durch den Infektionsprozess auf Weizen induziert.

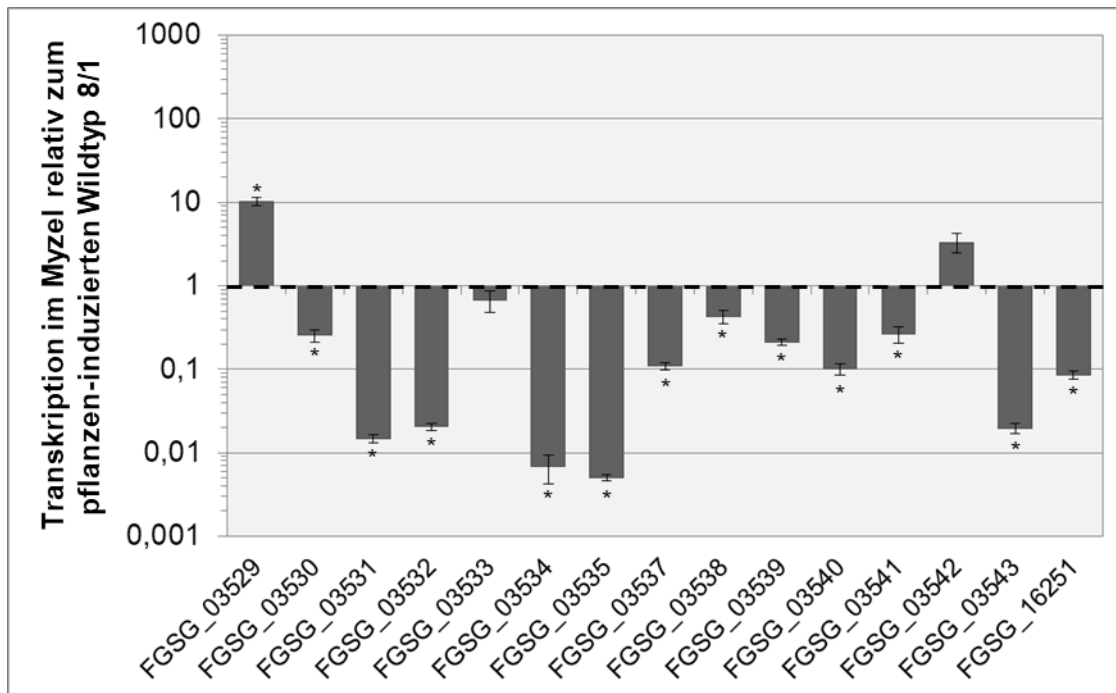


Abb. 72: Vergleich der Transkription des TRI-Clusters zwischen axenischem Myzel und während der frühen Infektion von Weizen. Transkriptionsniveau der 15 Gene des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese im Myzel (3 dpi) in Relation zum infizierten Weizen (Kultivar 'Nandu', 7 dpi). Die Transkriptionsstärke des Pflanzen-infizierenden Wildtyps 8/1 wurde auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde cDNA der jeweiligen Probe verwendet. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p \leq 0,000625$.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Mutationen in der $\Delta Gpmk1$, der $OE_{\Delta G}$ FGSG_03538 und der $OE_{\Delta G}$ FGSG_16251 auf die Expression des TRI-Clusters untersucht. Hierfür wurde ein Transkriptionsprofil der Cluster-Gene im Myzel (Abb. 73A) und während der Infektion von Weizen (Abb. 73B) erstellt. In diesem wird die Transkription in den verschiedenen Mutanten mit dem entsprechenden Wildtyp 8/1 in Relation gesetzt.

Im Myzel der $\Delta Gpmk1$ wurde das Gen FGSG_03529 auf einem mit dem Wildtyp 8/1 vergleichbaren Niveau transkribiert. Bei den Mutanten $OE_{\Delta G}$ FGSG_03538 und $OE_{\Delta G}$ FGSG_16251 lag die Menge an Transkript signifikant höher als bei dem Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ (Abb. 73A). Auf der Pflanze war die Transkription des Gens in allen drei Mutanten niedriger als im Wildtyp 8/1 (Abb. 73B).

Das Gen FGSG_03530 war sowohl im Myzel als auch während der Infektion ausschließlich in der Mutante $OE_{\Delta G}$ FGSG_16251 differentiell reguliert. Im Myzel war das Gen im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ signifikant schwächer transkribiert (Abb. 73A). Beim Infektionsprozess wurde das Gen hingegen signifikant stärker als in den beiden Vergleichsstämmen transkribiert (Abb. 73B).

In der Myzelkultur wurde das Gen FGSG_03531 in der Δ Gpmk1 auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 transkribiert. Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 war das Gen in der OE Δ G FGSG_03538 vermindert und in der OE Δ G FGSG_16251 verstärkt exprimiert (Abb. 73A). Im Pilzmaterial von der Pflanze wurde das Gen in der Δ Gpmk1 und der OE Δ G FGSG_03538 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant vermindert transkribiert. In der OE Δ G FGSG_16251 war ein signifikanter Unterschied weder zum Wildtyp 8/1 noch zur Δ Gpmk1 ausgeprägt. Tendenziell zeigt die Mutante allerdings eine Expression auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 (Abb. 73B).

Die Transkription des Gens FGSG_03532 war in der Δ Gpmk1 und der Mutante OE Δ G FGSG_03538 im Myzel und auf der Pflanze in Relation zum jeweiligen Wildtyp 8/1 signifikant verringert (Abb. 73A-B). Allerdings wurde das Gen während der Infektion von Weizen in der OE Δ G FGSG_03538 signifikant stärker transkribiert als in der Δ Gpmk1 (Abb. 73B). In der Überexpressionsmutante OE Δ G FGSG_16251 wurde das Gen im Myzel mit einem signifikanten Unterschied zur Δ Gpmk1 auf einem mit dem Wildtyp 8/1 vergleichbaren Niveau exprimiert (Abb. 73A). Während der Infektion von Weizen war das Gen zwar signifikant schwächer als im Wildtyp 8/1 transkribiert, aber auch signifikant stärker als in der Δ Gpmk1 (Abb. 73B).

Das Gen FGSG_03533 war im Myzel der Δ Gpmk1 signifikant schwächer transkribiert als im Wildtyp 8/1. In der OE Δ G FGSG_03538 lag die Transkription zwischen der des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1. Das FGSG_03533 war somit tendenziell stärker als in der Δ Gpmk1 reguliert, konnte das Niveau des Wildtyps 8/1 jedoch nicht erreichen.

In der Mutante OE Δ G FGSG_16251 wurde das Gen in Relation zu diesen beiden Vergleichsstämmen signifikant verstärkt transkribiert (Abb. 73A). Beim Wachstum auf der Pflanze wurde das Gen in der Δ Gpmk1 wesentlich schwächer transkribiert als im Wildtyp 8/1. In den Überexpressionsmutanten OE Δ G FGSG_03538 und OE Δ G FGSG_16251 war die Transkription signifikant gegenüber der Δ Gpmk1 erhöht. Die Expression in der Mutante OE Δ G FGSG_03538 war zusätzlich signifikant stärker als im Wildtyp 8/1 (Abb. 73B).

Die Transkription des Gens FGSG_03534 im Myzel war in allen drei Mutanten gegenüber dem Wildtyp 8/1 signifikant erhöht. Die OE Δ G FGSG_16251 zeigte dabei eine um etwa den Faktor 100 gesteigerte Expression. Diese war damit auch wesentlich höher als in der Δ Gpmk1 (Abb. 73A). Auf der Pflanze wurde das Gen hingegen in der Δ Gpmk1 schwächer als im Wildtyp 8/1 transkribiert. Das Transkriptionsniveau in den Mutanten OE Δ G FGSG_03538 und OE Δ G FGSG_16251 war miteinander vergleichbar und signifikant gegenüber dem Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 erhöht (Abb. 73B).

Im Myzel wurde das Gen FGSG_03535 in der Δ Gpmk1 signifikant schwächer transkribiert als im Wildtyp 8/1. In der Mutante OE Δ G FGSG_03538 war die Transkription in Relation zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 signifikant erhöht.

In der OE_{ΔG} FGSG_16251 wurde das Gen etwa auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 exprimiert und war somit signifikant gegenüber der ΔGpmk1 gesteigert (Abb. 73A). Während des Infektionsprozesses war das Gen in der ΔGpmk1 deutlich weniger transkribiert als im Wildtyp 8/1. In den Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 war das Gen hingegen stärker exprimiert als im Wildtyp 8/1. In der OE_{ΔG} FGSG_03538 führte dies zu einem signifikanten Unterschied zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1, in der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 ausschließlich zu einem gegenüber der ΔGpmk1 (Abb. 73B).

Das Gen FGSG_03537 wurde im Myzel der ΔGpmk1 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant vermindert transkribiert. Die Expression in den Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 war auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 und somit in Relation zur ΔGpmk1 signifikant erhöht (Abb. 73A). Während der Infektion von Weizen war das Gen in der ΔGpmk1 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 stark verringert. In der OE_{ΔG} FGSG_03538 war die Transkription tendenziell vergleichbar mit der des Wildtyps 8/1 und unterschied sich signifikant von der Regulation in der ΔGpmk1. Die Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 signifikant verstärkte Expression des Gens (Abb. 73B).

Das Transkriptionsprofil des Gens FGSG_03538 zeigte, dass bei der ΔGpmk1 im Myzel und auf der Pflanze kein Unterschied zum Wildtyp 8/1 bestand. In der Mutante OE_{ΔG} FGSG_03538 ist das untersuchte Gen durch die Veränderung des Genoms überexprimiert. Dies äußerte sich wie bei der initialen Charakterisierung der neu erstellten Mutanten (3.4.2.1.1) in einer signifikant im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und ΔGpmk1 erhöhten Transkription des Gens. Diese ist unabhängig von der getesteten Wachstumsbedingung, ist in Relation zum jeweiligen Wildtyp 8/1 im Myzel allerdings tendenziell höher als auf der Pflanze. In der Mutante OE_{ΔG} FGSG_16251 ist das Gen sowohl im Myzel als auch während der Infektion von Weizen im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 signifikant verstärkt transkribiert (Abb. 73A-B).

Das Gen FGSG_03539 ist im Myzel ausschließlich in der Mutante OE_{ΔG} FGSG_03538 im Verhältnis zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 signifikant stärker transkribiert. In der ΔGpmk1 und der OE_{ΔG} FGSG_16251 lag die Transkription auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 (Abb. 73A). Auf der Pflanze wurde das Gen in der ΔGpmk1 und der OE_{ΔG} FGSG_16251 signifikant gegenüber dem Wildtyp 8/1 vermindert transkribiert. In der Mutante OE_{ΔG} FGSG_03538 wurde das Gen hingegen im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 wesentlich stärker exprimiert (Abb. 73B).

Im Myzel wurde das Gen FGSG_03540 in der ΔGpmk1 auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 transkribiert. In den Mutanten OE_{ΔG} FGSG_03538 und OE_{ΔG} FGSG_16251 war die Transkription des Gens im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der ΔGpmk1 signifikant verstärkt (Abb. 73A).

Während des Infektionsprozesses wurde das Gen sowohl in der Δ Gpmk1 als auch in der Mutante OE Δ G FGSG_16251 signifikant weniger stark als im Wildtyp 8/1 exprimiert. In der OE Δ G FGSG_03538 wurde das Gen in Relation zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 wesentlich stärker transkribiert (Abb. 73B).

Die Transkription des Gens FGSG_03541 war im Myzel der Δ Gpmk1 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant erhöht. In der Überexpressionsmutante OE Δ G FGSG_03538 wurde das Gen auf einem mit dem Wildtyp 8/1 vergleichbaren Niveau transkribiert. Dies war ein signifikanter Unterschied zur Δ Gpmk1. In der OE Δ G FGSG_16251 war die Expression des Gens in Relation zu den beiden Vergleichsstämmen signifikant erhöht (Abb. 73A). Während der Infektion auf Weizen wurde das Gen in der Δ Gpmk1 wie im Wildtyp 8/1 transkribiert. In den Mutanten OE Δ G FGSG_03538 und OE Δ G FGSG_16251 war die Transkription im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 signifikant verstärkt (Abb. 73B).

Das Gen FGSG_03542 wurde sowohl im Myzel als auch auf der Pflanze im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant vermindert transkribiert. In der OE Δ G FGSG_03538 wurde das Gen unter beiden Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant bzw. tendenziell verstärkt exprimiert. Die Transkription in der Mutante OE Δ G FGSG_16251 war im Myzel in Relation zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 signifikant erhöht. Während der Infektion von Weizen war das Gen in dieser Mutante hingegen tendenziell wie in der Δ Gpmk1 reguliert und somit signifikant verschieden zum Wildtyp 8/1 (Abb. 73A-B).

Das Transkriptionsprofil des Gens FGSG_03543 zeigte, dass das Gen in der Myzelkultur und während der Infektion von Weizen in der Δ Gpmk1 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant vermindert transkribiert wurde (Abb. 73A-B). In der OE Δ G FGSG_03538 wurde das Gen im Myzel etwa auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 exprimiert und war somit signifikant gegenüber der Δ Gpmk1 erhöht. In der Mutante OE Δ G FGSG_16251 war die Transkription des Gens im Myzel signifikant gegenüber dem Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 erhöht (Abb. 73A). Beim Infektionsprozess war das Gen in den beiden Mutanten OE Δ G FGSG_03538 und OE Δ G FGSG_16251 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 signifikant verstärkt transkribiert (Abb. 73B).

Das Gen FGSG_16251 wurde im Myzel der Δ Gpmk1 signifikant schwächer exprimiert als im Wildtyp 8/1. Bei der Mutante OE Δ G FGSG_03538 war die Transkription auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 (Abb. 73A). Auf der Pflanze war das Gen in der Δ Gpmk1 tendenziell schwächer als im Wildtyp 8/1 transkribiert. In der OE Δ G FGSG_03538 war das Gen tendenziell etwas höher als im Wildtyp 8/1 exprimiert (Abb. 73B). Da es sich bei dem Gen FGSG_16251 um das in der OE Δ G FGSG_16251 überexprimierte Gen handelt, war es, wie in der vorherigen Untersuchung (3.4.2.1.1), im Myzel um ein Vielfaches stärker transkribiert als im Myzel des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1. Auch während der Weizeninfektion war die Transkription des Gens in der Überexpressionsmutante wesentlich stärker als in den beiden Vergleichsstämmen (Abb. 73A-B).

Zusammenfassend kann aus dieser Analyse geschlossen werden, dass die Deletion der Gpmk1 in *F. graminearum* in einer axenischen Myzelkultur oder während der Infektion von Weizen zu einer veränderten Regulation nahezu aller TRI-Cluster-Gene führt. Ausschließlich die Gene FGSG_03530 und FGSG_03538 werden unter keiner der beiden Bedingungen wesentlich beeinflusst. Insbesondere das Schlüssel-Enzym des Clusters TRI5 (FGSG_03537) wird durch die Deletion der Gpmk1 beim Wachstum im Myzel und während des Infektionsprozesses im Vergleich zum Wildtyp 8/1 stark herunterreguliert.

Die Überexpression des Gens FGSG_03538 in der Δ Gpmk1 führt zu einer veränderten Transkription von 13 Genen des Clusters. Weder auf der Pflanze noch im Myzel werden die Gene FGSG_03530 und FGSG_16251 in ihrer Expression im Vergleich zu der Ursprungsmutante Δ Gpmk1 beeinflusst. Das Schlüssel-Enzym TRI5 wird durch die Überexpression sowohl im Myzel als auch im Rahmen der Infektion auf dem Niveau des Wildtyps 8/1 transkribiert.

Die Überexpression des Gens FGSG_16251 in der Δ Gpmk1 hat ausschließlich auf das Gen FGSG_03539 keinen Einfluss. Das Protein TRI5 wird in der OE Δ G FGSG_16251 bei einer axenischen Kultur auf einem Niveau des Wildtyps 8/1 exprimiert. Auf der Pflanze erhöht sich die Transkription des Gens im Vergleich zum Wildtyp 8/1 hingegen um ein Vielfaches.

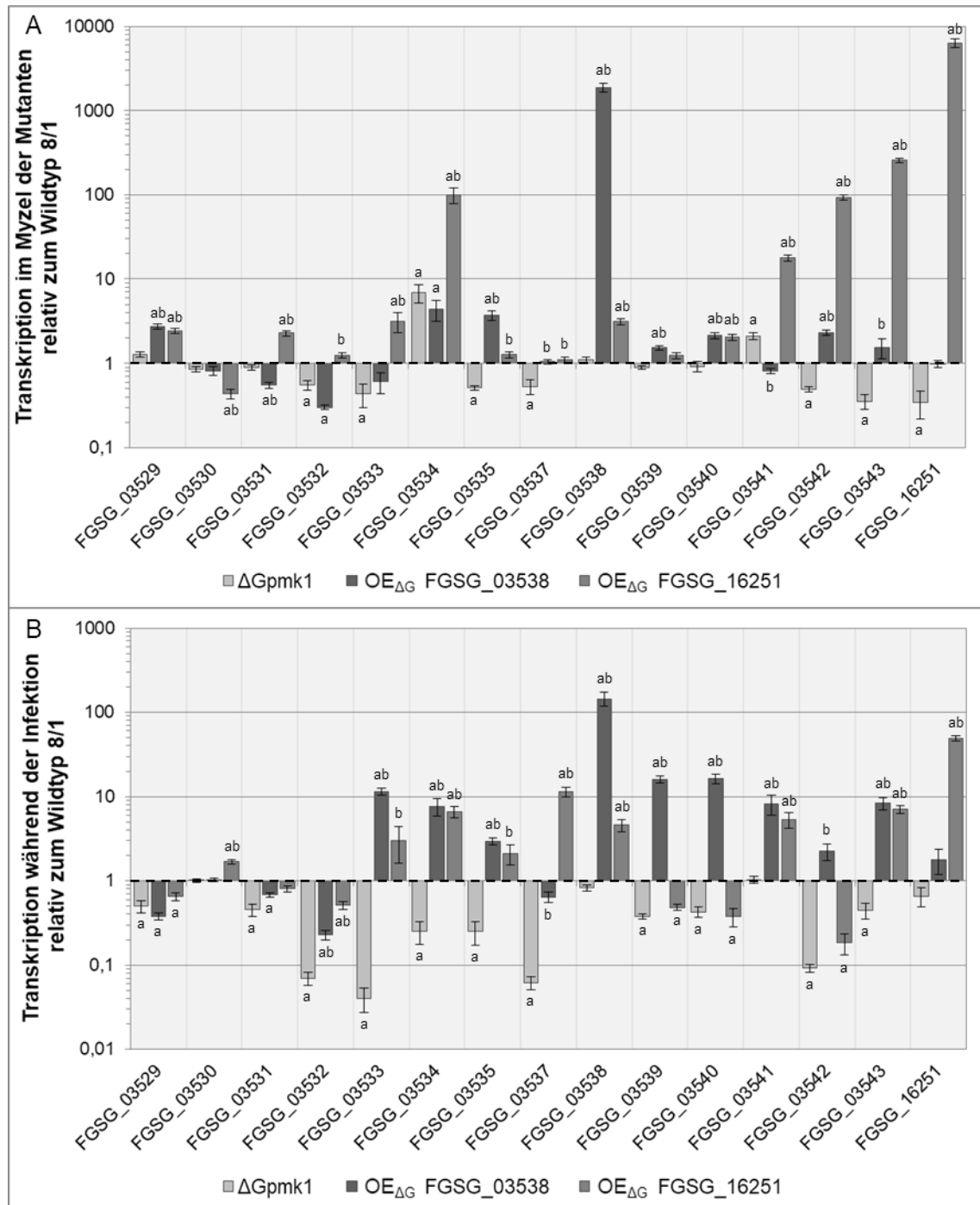


Abb. 73: Transkriptionsprofil des TRI-Clusters in Myzel und während der frühen Infektion von Weizen. Die Transkription der Gene des TRI-Clusters im Myzel (3 dpi) **(A)** und in bei der Infektion von Weizen (Kultivar 'Nandu', 7 dpi) gebildetem Pilzmaterial **(B)** der Δ Gpmk1 und den Überexpressionsmutanten OE Δ G FGSG_03538 (OE Δ G TRI10) und OE Δ G FGSG_16251 (OE Δ G TRI6) in Relation zum Wildtyp 8/1. Das Transkriptionsniveau des Wildtyps 8/1 wurde auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde cDNA der jeweiligen Probe verwendet. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. Cluster-Gen-Bezeichnung: FGSG_03529 (-), FGSG_03530 (-), FGSG_03531 (-), FGSG_03532 (TRI8), FGSG_03533 (TRI7), FGSG_03534 (TRI3), FGSG_03535 (TRI4), FGSG_03537 (TRI5), FGSG_03538 (TRI10), FGSG_03539 (TRI9), FGSG_03540 (TRI11), FGSG_03541 (TRI12), FGSG_03542 (TRI13), FGSG_03543 (TRI14), FGSG_16251 (TRI6). a: Signifikanz ggb. zugehörigem WT 8/1, b: Signifikanz ggb. zugehöriger Δ Gpmk1. $p^{a,b} \leq 0,000625$.

3.4.3 Die putativen Effektorproteine FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514

3.4.3.1 Charakterisierung der Deletionsmutanten im Wildtyp 8/1

3.4.3.1.1 Deletion der putativen Effektorproteine FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514 im Wildtyp 8/1

Die Konstruktion der Deletionsmutanten der Gene FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514 im Wildtyp 8/1 wurde durch die Substitution des jeweiligen Gens mit der Nourseothricin-Resistenzkassette (NAT) durchgeführt. Das jeweilige Gen wurde durch homologe Rekombination durch doppeltes Crossing-Over an das Gen flankierenden Bereichen im Genom des Wildtyps 8/1 ersetzt. Es wurde für jedes Gen ein Knockout-Vektor mittels Hefe-Rekombinations-Klonierung (2.2.10) erstellt. Die KO-Konstrukte in dem jeweiligen Vektor bestehen aus einer linken und rechten Gen-Flanke und der Resistenzkassette für Nourseothricin (Anhang A). Die Vektoren wurden über *E. coli* vervielfältigt (2.2.5, 2.2.6) und zum Erhalt des jeweiligen KO-Konstrukts mit den folgenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Für den Vektor zur Deletion des Gens FGSG_02685 „pΔ02685“ wurden die Enzyme *Bgl*II und *Not*I eingesetzt, für den Vektor zur Ausschaltung des Gens FGSG_07026 „pΔ07026“ die Enzyme *Bsa*I und *Not*I, für den Vektor zum Knock-Out des Gens FGSG_11047 „pΔ11047“ die Enzyme *Bmr*I und *Not*I und für den Vektor zum Ersetzen des Gens FGSG_12514 „pΔ12514“ die Enzyme *Taq*II und *Not*I (2.2.8). Die isolierten Konstrukte wurden über Silica-Säulen aufgereinigt (2.2.3) und es wurden jeweils 6 µg der reinen KO-Konstrukte für die Transformation des *F. graminearum* Wildtyps 8/1 verwendet (2.2.12).

Die erhaltenen Transformanten (FGSG_02685: #1953, FGSG_07026: #1954, FGSG_11047: #1971, FGSG_12514: #1955) wurden auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von 100 µg/ml des Antibiotikums Nourseothricin selektiert und angezogen (2.2.13).

Die Transformanten wurden einer Diagnose mittels PCR unterzogen (2.2.1.1). Dabei wurde eine Amplifikation einer internen Sequenz des jeweiligen potentiell ausgeschalteten Gens versucht und eine Kontrollreaktion auf einen nicht modifizierten Bereich des Gens FGSG_00845 mit den Primern „GScreen_for“ und „GScreen_rev“ durchgeführt.

Im Test auf Deletion des FGSG_02685 konnte das Gen-interne Fragment (Primer: „02685_int_for“ und „02685_int_rev“, 336 bp) beim Wildtyp 8/1 und fünf der elf kontrollierten Transformanten (#1953) amplifiziert werden. Bei einer Mutante konnte keine erfolgreiche Amplifikation der beiden Analysefragmente durchgeführt werden. Somit konnten fünf Deletionsmutanten des Gens FGSG_02685 identifiziert werden. Die Mutante #1953.2 wurde einer Konidienvereinzelung unterzogen (2.2.12). Die erste isolierte Konidie wird im Folgenden als Δ_{WT} FGSG_02685 bezeichnet.

Bei Untersuchung der Transformanten (#1954) auf die Deletion des Gens FGSG_07026 konnte das Gen-interne Fragment (Primer: „07026_int_for“ und „07026_int_rev“, 392 bp) bei drei Mutanten nicht amplifiziert werden. Diese wurden somit als Deletionsmutanten identifiziert. Nach einer Konidienvereinzelung wurde die Transformante #1954.8.1 zu Δ_{WT} FGSG_07026 benannt.

Die Kontrolle auf eine Deletion des Gens FGSG_11047 in den erhaltenen Transformanten (#1971) führte zu einer Amplifikation des Gen-internen Fragments (Primer: „11047_int_for“ und „11047_int_rev“, 347 bp) bei der Wildtyp 8/1-Kontrolle und drei der elf Transformanten. Es konnten somit acht Deletionsmutanten ausgemacht werden. Die Konidien der Transformante #1971.1 wurden vereinzelte und die erste Konidie wurde als Δ_{WT} FGSG_11047 bezeichnet.

Bei der Transformanten der Ausschaltung des FGSG_12514 (#1954) konnte das Gen-interne Kontrollfragment (Primer: „12514_int_for“ und „12514_int_rev“, 353 bp) bei sechs Transformanten nicht synthetisiert werden. Diese wurden somit als Deletionsmutanten ermittelt. Die erste vereinzelte Konidie der Transformante #1954.4 wird folgend als Δ_{WT} FGSG_12514 bezeichnet.

Für jedes der vier Gene putativer Effektorproteine konnten somit mehrere Deletionsmutanten erfolgreich erstellt und identifiziert werden.

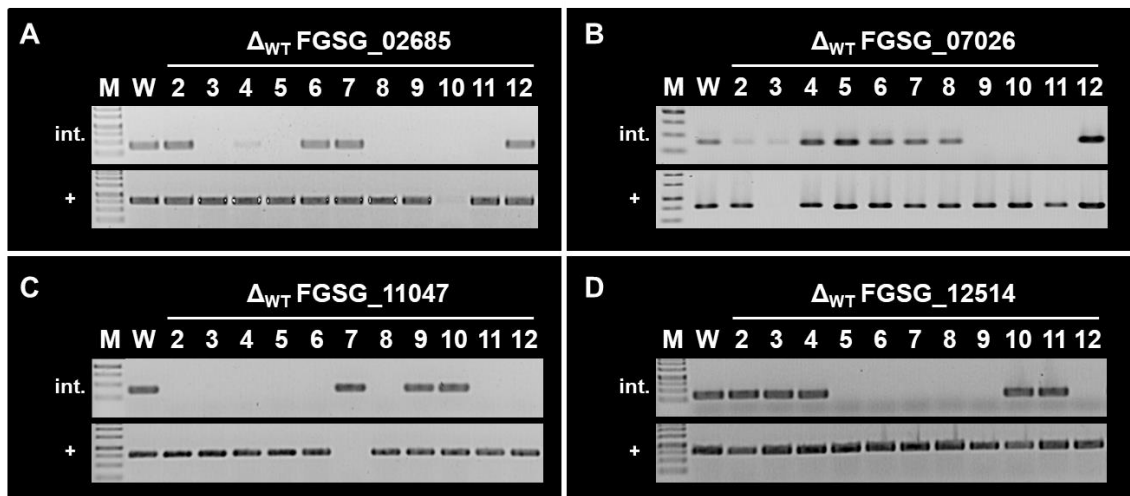


Abb. 74: PCR zur Analyse der Effektor-Deletionsmutanten Δ_{WT} FGSG_02685, Δ_{WT} FGSG_07026, Δ_{WT} FGSG_11047 und Δ_{WT} FGSG_12514. A: Oberes Gel: Synthese eines Gen-internen Fragments des Gens FGSG_02685 (int.), unteres Gel: Synthese des nicht modifizierten Gens FGSG_00845 zur Kontrolle (+). M: Generuler 1kb, W: gDNA 8/1 DsRed, 2 bis 12: gDNA #1953.1 bis #1953.11. B: Oberes Gel: Synthese eines Gen-internen Fragments des Gens FGSG_07026 (int.), unteres Gel: Synthese des nicht modifizierten Gens FGSG_00845 zur Kontrolle (+). M: Generuler 1kb, W: gDNA 8/1 DsRed, 2 bis 12: gDNA #1954.1 bis #1954.11. C: Oberes Gel: Synthese eines Gen-internen Fragments des Gens FGSG_11047 (int.), unteres Gel: Synthese des nicht modifizierten Gens FGSG_00845 zur Kontrolle (+). M: Generuler 1kb, W: gDNA 8/1 DsRed, 2 bis 12: gDNA #1971.1 bis #1971.11. D: Oberes Gel: Synthese eines Gen-internen Fragments des Gens FGSG_12514 (int.), unteres Gel: Synthese des nicht modifizierten Gens FGSG_00845 zur Kontrolle (+). M: Generuler 1kb, W: gDNA 8/1 DsRed, 2 bis 12: gDNA #1955.1 bis #1955.11.

3.4.3.1.2 Infektionsstudie mit den Effektor-Deletionsmutanten Δ_{WT} FGSG_02685, Δ_{WT} FGSG_07026, Δ_{WT} FGSG_11047 und Δ_{WT} FGSG_12514 auf Weizen

Der Effekt der Deletion der Gene FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514 auf die Pathogenität des Wildtyps 8/1 auf Weizen wurde in einer Infektionsstudie untersucht. Hierfür wurde das Weizenkultivars 'Nandu' mit Konidien des jeweiligen Stamms inokuliert und nach 21 Tagen dokumentiert (2.2.17.1). Keine der getesteten Mutanten zeigte einen Unterschied zum Infektionsverlauf des unveränderten Wildtyps 8/1. Die Inokulation führte unabhängig vom verwendeten Stamm zu einer vollständigen Infektion und somit zum vorzeitigen Ausbleichen der Ähre (Abb. 75)



Abb. 75: Infektionsstudie auf Weizen mit den Effektor-Deletionsmutanten. Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu') durch den Wildtyp 8/1, die Δ_{Gpmk1} und durch die vier Deletionsmutanten Δ_{WT} FGSG_02685, Δ_{WT} FGSG_07026, Δ_{WT} FGSG_11047 und Δ_{WT} FGSG_12514, jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet.

3.4.4 Die Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597)

3.4.4.1 Charakterisierung der Überexpressionsmutanten im Wildtyp 8/1

3.4.4.1.1 Überexpression der Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597) im Wildtyp 8/1

Zur Konstruktion der Überexpressionsmutanten der Gene FGSG_03597 und FGSG_16620 im Wildtyp 8/1 wurde ein Vektor zur Transformation von *F. graminearum* benötigt. In diesem Überexpressionsvektor wird eine Kopie des jeweiligen Gens durch den Promotor *gpdA* aus *A. nidulans* reguliert. Dieser Promotor führt zu einer konstitutiven Transkription des regulierten Gens. Zur Erstellung der Vektoren wurde das jeweilige Gen durch eine PCR auf dem Genom des *F. graminearum* Wildtyps 8/1 amplifiziert (2.2.1.1). Dabei wurden die Oligonukleotidpaare „03597_Apal_for“ und „03597_NotI_rev“ bzw. „16620_Apal_for“ und „16620_NotI_rev“ mit jeweils einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen *Apal* bzw. *NotI* für eine folgende gerichtete Ligation des Fragments in den Überexpressionsvektor eingesetzt. Die Produkte der PCR wurden jeweils in den Vektor „pJET1.2/blunt“ ligiert (2.2.4) und über *E. coli* vervielfältigt (2.2.5, 2.2.6). Um die Gene FGSG_03597 bzw. FGSG_16620 aus diesen Vektoren wieder zu isolieren, wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *Apal* und *NotI* vorgenommen (2.2.8). Auch der Überexpressionsvektor „pAN7.1_GluA“ wurde zur Linearisierung mit diesen Enzymen restringiert (2.2.8). Das jeweilige Gen wurde in den linearisierten Vektor ligiert (2.2.4). Die erstellten Überexpressionsvektoren wurden als „pOE03597“ und „pOE16620“ bezeichnet (Anhang B).

Zur weiteren Amplifikation wurden die Vektoren in *E. coli* transformiert (2.2.5) und eine Plasmid-Präparation durchgeführt (2.2.6). Vor der folgenden Transformation des *F. graminearum* Wildtyps 8/1 wurden die Vektoren zur Kontrolle der Integration sequenziert (2.2.7). Für beide Gene wurden jeweils 7 µg des jeweiligen, mit der Endonuklease *AhdI* linearisierten Vektors in der Transformation eingesetzt (2.2.12).

Die erhaltenen Transformanten wurden auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von 100 µg pro ml des Antibiotikums Hygromycin B selektiert (2.2.13). Nach der Vereinzelung von Konidien (2.2.12) wurden jeweils für beide Gene fünf Transformanten für eine Analyse mittels qRT-PCR ausgewählt (2.2.1.3). Hierfür wurde die RNA aus drei Tage gewachsenen Myzel-Flüssigkulturen isoliert (2.2.13, 0) und zu cDNA umgeschrieben (2.2.1.2). Diese wurde in der qRT-PCR zur Amplifikation einer internen Sequenz des jeweiligen Gens verwendet (2.2.1.3). Das Fragment hatte für das Gen FGSG_03597 eine Größe von 159 bp (Primer: „03597_qPCR_for“ und „03597_qPCR_rev“) und für das Gen FGSG_16620 von 166 bp (Primer: „16620_qPCR_for“ und „16620_qPCR_rev“).

Das Transkriptionsprofil der untersuchten Transformanten zeigte, dass die Überexpression des Gens FGSG_03597 in allen fünf Mutanten erfolgreich vorgenommen wurde.

Die Stärke der Transkription lag im Vergleich zum Wildtyp 8/1 auf einem um etwa den Faktor 100 bis 900 erhöhten Niveau (Abb. 76A). Auch die Überexpression des Gens FGSG_16620 konnte in vier der fünf getesteten Mutanten nachgewiesen werden. Bei erfolgreicher Überexpression war die Transkription um das 20- bis 120-fache gesteigert. Nur die Mutante M1 zeigte keine verstärkte Transkription des Gens (Abb. 76B).

Somit wurden für beide Gene erfolgreich Überexpressionsmutanten im Wildtyp 8/1 erstellt und identifiziert. In der folgenden Charakterisierung wurden die Mutanten als OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 bezeichnet. Bei individueller Betrachtung der getesteten Mutanten M1 und M2 wird diese Benennung weiterhin angewendet. Die Mutante OE_{WT} FGSG_16620 M3 wird im Folgenden als Mutante M1 bezeichnet.

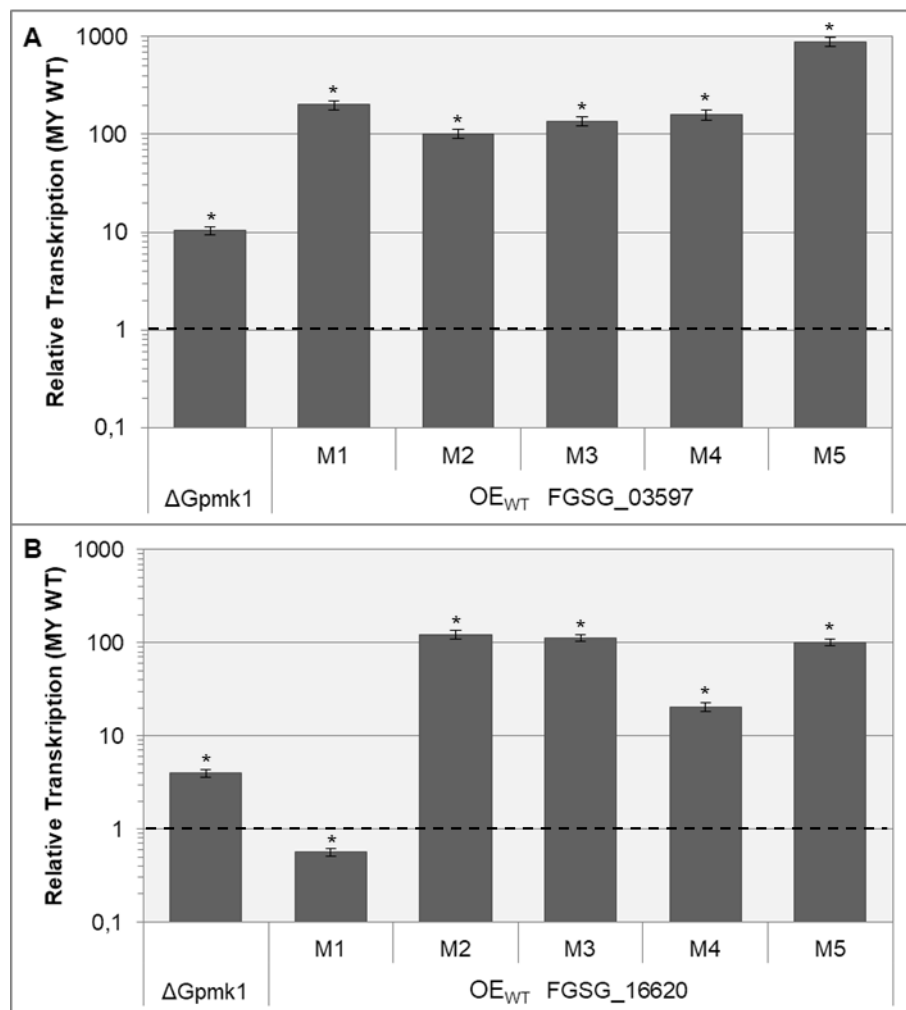


Abb. 76: Transkriptionsprofil der Gene FGSG_03597 und FGSG_16620 in verschiedenen Mutanten in Relation zum Wildtyp 8/1. Die relative Transkription des FGSG_03597 (**A**) und des FGSG_16620 (**B**) der Δ Gpmk1 und jeweils fünf unabhängiger Überexpressionsmutanten (M1 bis M5) der OE_{WT} FGSG_03597 und der OE_{WT} FGSG_16620 im Vergleich zum des Wildtyps 8/1 (WT MY). Das Transkriptionsniveau des Wildtyps 8/1 wurde auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde cDNA aus dem jeweiligen Myzel verwendet (3 dpi). Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^*=0,00083$.

3.4.4.1.2 Infektionsstudie mit der OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 auf Weizen

Die Überexpressionsmutanten der Gene FGSG_03597 und FGSG_16620 im Wildtyp 8/1 wurden durch eine Infektionsstudie auf Weizen auf ihre Pathogenität untersucht. Es wurden dafür das *F. graminearum*-anfällige Weizenkultivar 'Nandu' und das von Natur aus nahezu infektionsresistente Kultivar 'Amaretto' mit Konidien des jeweiligen Stamms inokuliert und nach 21 Tagen ausgewertet (2.2.17.1).

Die Infektion des Weizenkultivars 'Nandu' durch die Mutante OE_{WT} FGSG_03597 gleicht einer Infektion durch den unmodifizierten Wildtyp 8/1. Die gesamte Ähre konnte infiziert werden (Abb. 77A). Auf dem Weizenkultivar 'Amaretto' verlief die Infektion durch die Mutante OE_{WT} FGSG_03597 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 deutlich stärker. Die Mutante war in der Lage etwa 78 % der Ähre zu infizieren. Dies ist in Relation zum Wildtyp 8/1, der etwa 12 % einer Ähre des Kultivars 'Amaretto' infizieren konnte, eine erhöhtes Infektionspotential um etwa 66 % (Abb. 77B, Abb. 78).

Die Mutante OE_{WT} FGSG_16620 gleicht in ihrer Pathogenität auf den Weizenkultivaren 'Nandu' und 'Amaretto' dem Wildtyp 8/1. Auf dem Kultivar 'Nandu' führte eine Inokulation mit der Mutante zu einer vollständigen Infektion der Ähre (Abb. 79). Die Infektion einer Ähre des Weizenkultivars 'Amaretto' mit der Mutante war wie beim Wildtyp 8/1, auf den direkt angrenzenden Bereich der inokulierten Ähre beschränkt (Daten nicht gezeigt).



Abb. 77: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_03597. Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar 'Nandu' (A), Kultivar 'Amaretto' (B)) durch den Wildtyp 8/1, die $\Delta Gpmk1$ und durch zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_03597 (M1 und M2), jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet.

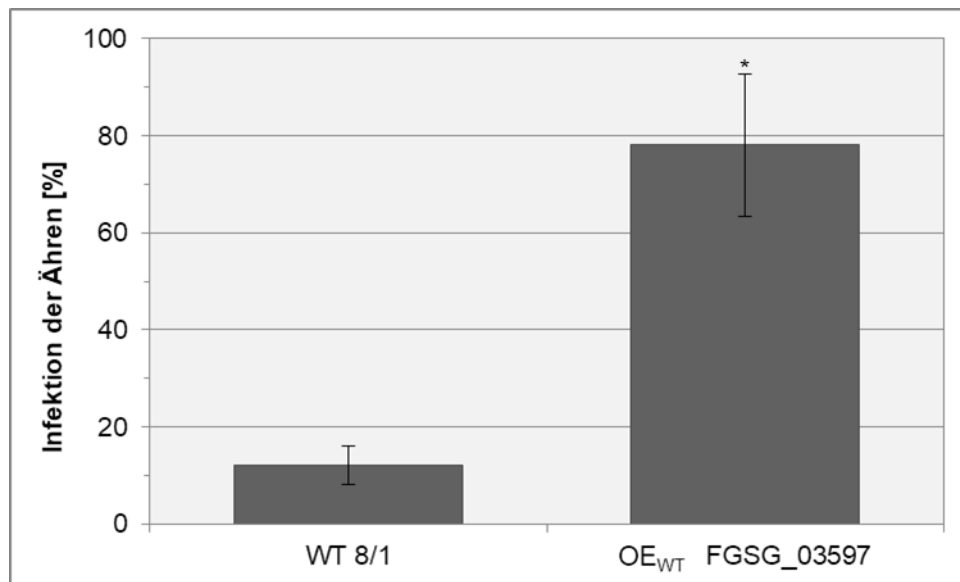


Abb. 78: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar ‘Amaretto’ mit der Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_03597. Relative Infektion einer Ähre (21 dpi) durch den Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und die OE_{WT} FGSG_03597. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. $p^* \leq 0,0025$.

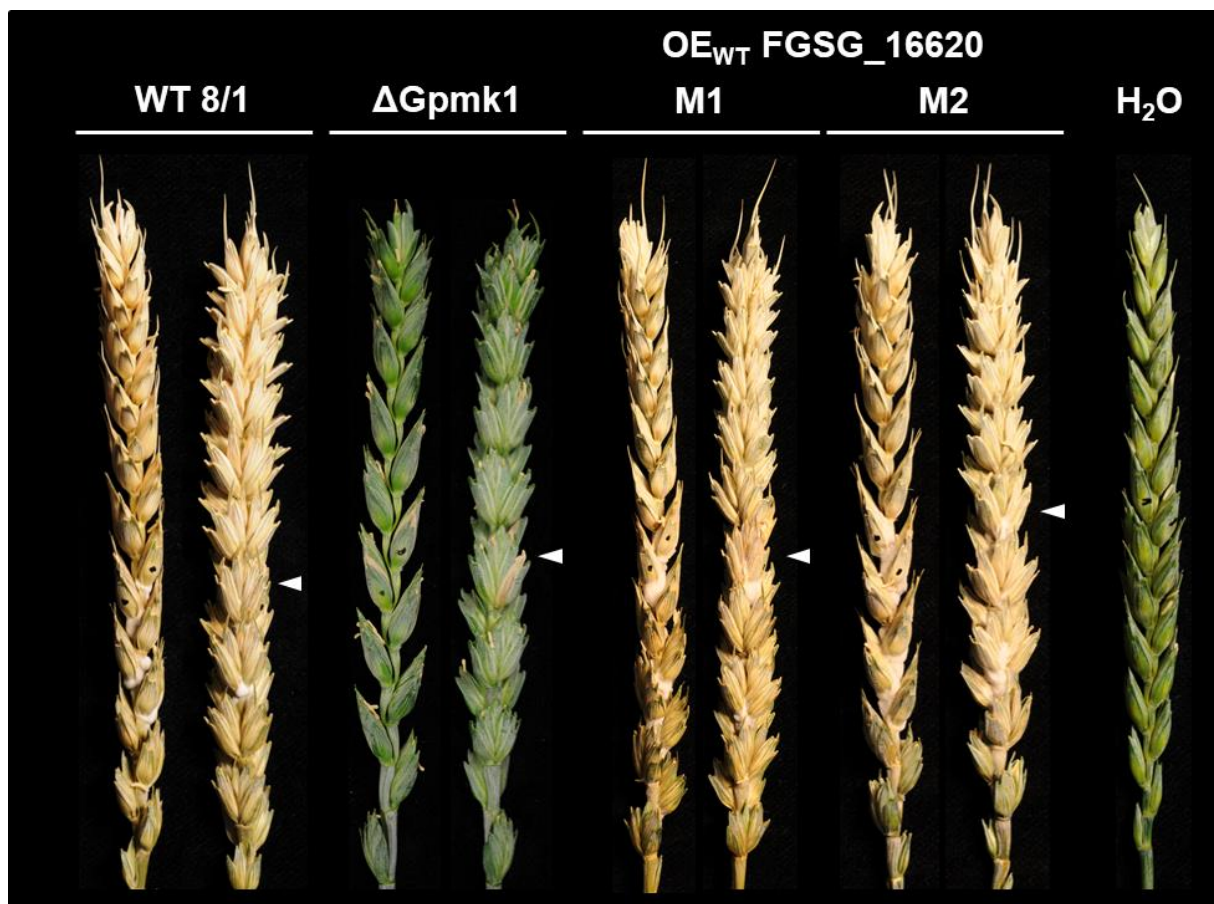


Abb. 79: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_16620. Infektion von Weizenähren (21 dpi) (Kultivar ‘Nandu’) durch den Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und durch zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_16620 (M1 und M2), jeweils in Frontalansicht (linke Ähre) und Seitenansicht (rechte Ähre). Die Inokulation wurde an den mit schwarzen Punkten und Pfeilen gekennzeichneten Ährchen durchgeführt. Die mit H₂O gekennzeichnete Ähre wurde mit sterilem Wasser scheininokuliert. Es wurden jeweils 14 unabhängige Replikate ausgewertet.

3.4.4.1.3 Asexuelle Reproduktion der OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620

Zur Analyse der asexuellen Reproduktion der Mutanten OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 wurde die Konidienbildung durch eine Inokulation von flüssigem Induktionsmedium aus Weizenblättern eingeleitet und nach sechs Tagen vergleichend zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 ausgewertet (2.2.13).

Der Wildtyp 8/1 produzierte in diesem Zeitraum etwa 64 Konidien pro μ l, die Δ Gpmk1 etwa 122 Konidien pro μ l und die Mutante OE_{WT} FGSG_03597 etwa 67 Konidien pro μ l. Damit ist die Reproduktionsrate dieser Mutante vergleichbar mit der des Wildtyps 8/1. Die Mutante OE_{WT} FGSG_16620 hat insgesamt nur etwa 20 Konidien pro μ l gebildet. Dies entspricht einer signifikanten Verringerung der asexuellen Reproduktion auf etwa 31 % der Konidienkonzentration des Wildtyps 8/1 (Abb. 80).

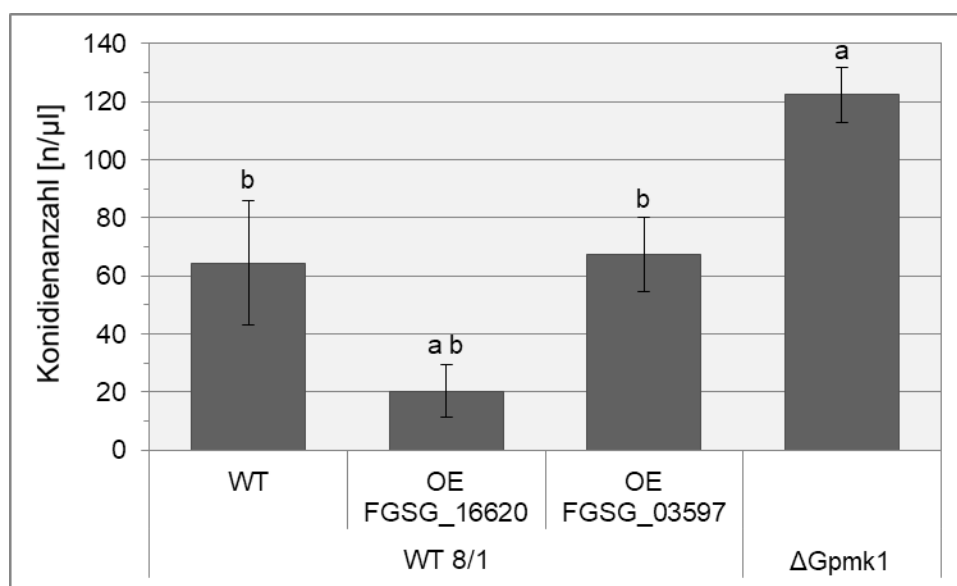


Abb. 80: Asexuelle Reproduktion der Überexpressionsmutanten OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 in flüssigem Weizenmedium. Die Produktion von Konidien des Wildtyps 8/1, der Δ Gpmk1, der OE_{WT} FGSG_03597 und der OE_{WT} FGSG_16620 wurde durch Zählung der gebildeten Konidien (6 dpi) untersucht. Es wurden drei biologische Replikate von drei unabhängigen Überexpressionsmutanten ausgewertet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. Δ Gpmk1. $p^{a,b} \leq 0,000025$.

3.4.4.1.4 Die OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 unter osmotischem und oxidativem Stress

Zur Untersuchung des Einflusses einer Überexpression der Gene FGSG_03597 und FGSG_16620 auf das Wachstum der jeweiligen Mutante unter osmotischem und oxidativem Stress wurde eine Wachstumsstudie auf CM-Festmedium mit einem Zusatz von Natriumchlorid (NaCl) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (2.2.18).

Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 führte die gesteigerte Expression des Gens FGSG_03597 in der Mutante OE_{WT} FGSG_03597 unter normalen Wachstumsbedingungen auf CM-Festmedium zu einer leichten Verringerung des generellen Wachstums um etwa 4 %. Die Mutante OE_{WT} FGSG_16620 zeigte hingegen unter diesen Wachstumsvorraussetzungen einen in Relation zum Wildtyp 8/1 um etwa 7 % gesteigerten Koloniedurchmesser (Abb. 81, Abb. 82, Abb. 83).

In den beiden Mutanten OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 führte eine Zugabe von 0,8 M NaCl zum Medium zu einer Steigerung des Wachstums um etwa 19 % bzw. 14 %. Dies entsprach in beiden Fällen im Vergleich zum Wildtyp 8/1 einer Verstärkung des positiven Effekts auf das Wachstum bei 0,8 M NaCl um 11 % bei der Mutante OE_{WT} FGSG_03597 und um 6 % bei der Mutante OE_{WT} FGSG_16620 (Abb. 81, Abb. 82, Abb. 83).

Durch die Supplementation von 1,2 M NaCl verringerte sich, wie bei den Referenzstämmen, der Koloniedurchmesser beider Mutanten. Dabei zeigte sich allerdings eine im Vergleich zum Wildtyp 8/1 signifikant erhöhte Toleranz gegenüber dem ausgelösten osmotischen Stress. Das Wachstum der Mutante OE_{WT} FGSG_03597 wurde durch NaCl dieser Konzentration um etwa 13 % und das Wachstum der Mutante OE_{WT} FGSG_16620 um etwa 8 % weniger gehemmt (Abb. 81, Abb. 82, Abb. 83).

Das Auslösen von oxidativem Stress durch H₂O₂ führte bei allen getesteten Stämmen zu einer Reduktion des Wachstums. Die Mutante OE_{WT} FGSG_03597 reagierte auf 10 mM und 15 mM H₂O₂ vergleichbar mit dem Wildtyp 8/1 mit einer Verringerung des Wachstums um etwa 11 % bzw. 14 %. Bei Zugabe von 20 mM H₂O₂ stieg die Empfindlichkeit gegenüber dem induzierten oxidativen Stress im Vergleich zum Wildtyp 8/1 um etwa 13 % an und führte zu einer um etwa 39 % reduzierten Koloniegröße (Abb. 84, Abb. 86).

Die Mutante OE_{WT} FGSG_16620 verhielt sich bei 10 mM wie der Wildtyp 8/1, zeigte aber bei steigenden Konzentrationen von H₂O₂ eine erhöhte Toleranz. Bei Zugabe von 15 mM H₂O₂ wurde das Wachstum insgesamt um etwa 8 % inhibiert und somit um etwa 9 % weniger als der Wildtyp 8/1. Die Supplementation des Mediums mit 20 mM H₂O₂ verursachte eine Verringerung um etwa 14 %. Dies ist eine um etwa 13 % verringerte Reaktion auf 20 mM H₂O₂ in Relation zum Wildtyp 8/1 (Abb. 85, Abb. 86).

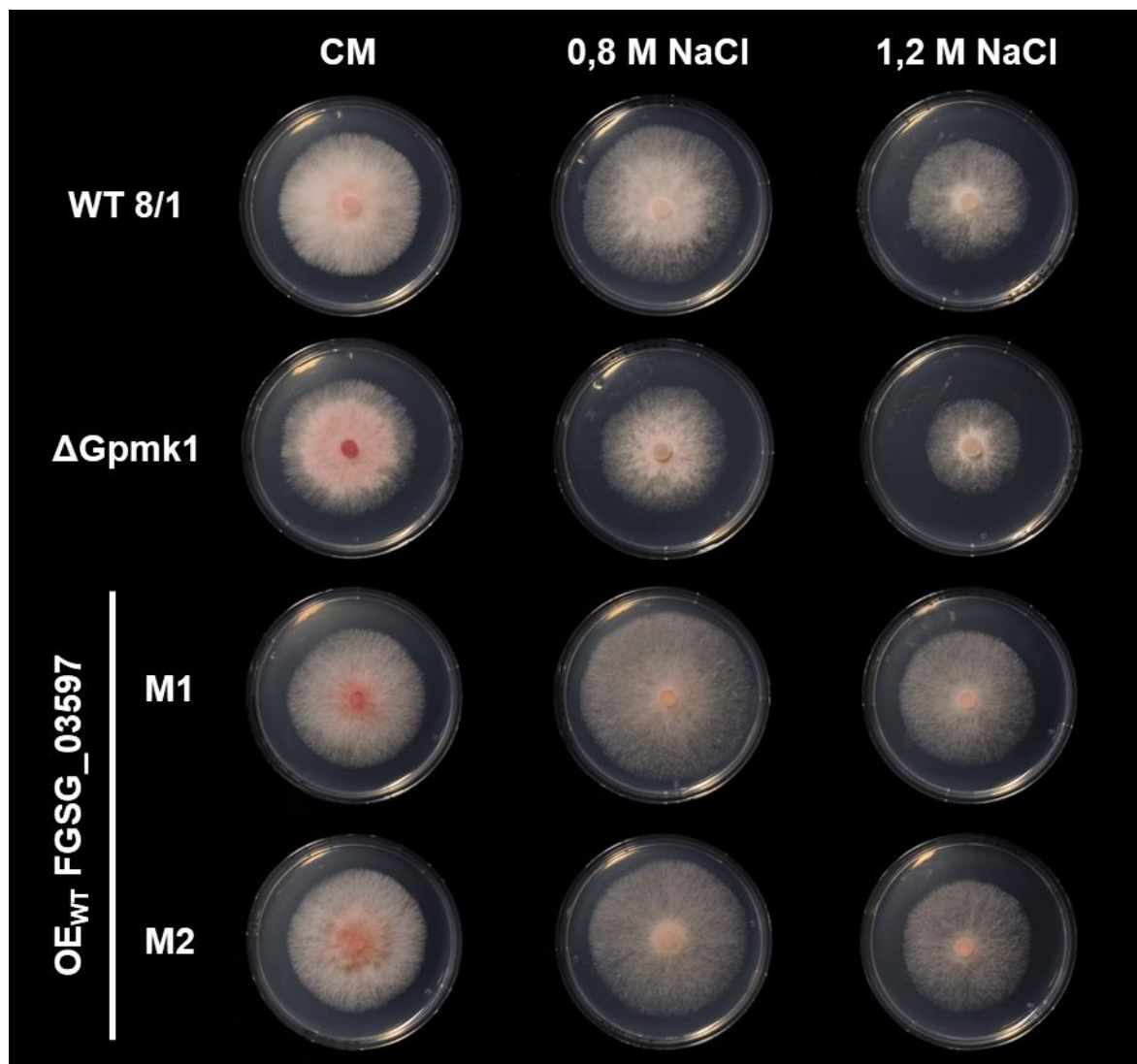


Abb. 81: Wachstum der OE_{WT} FGSG_03597 unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_03597 (M1 und M2) verwendet.

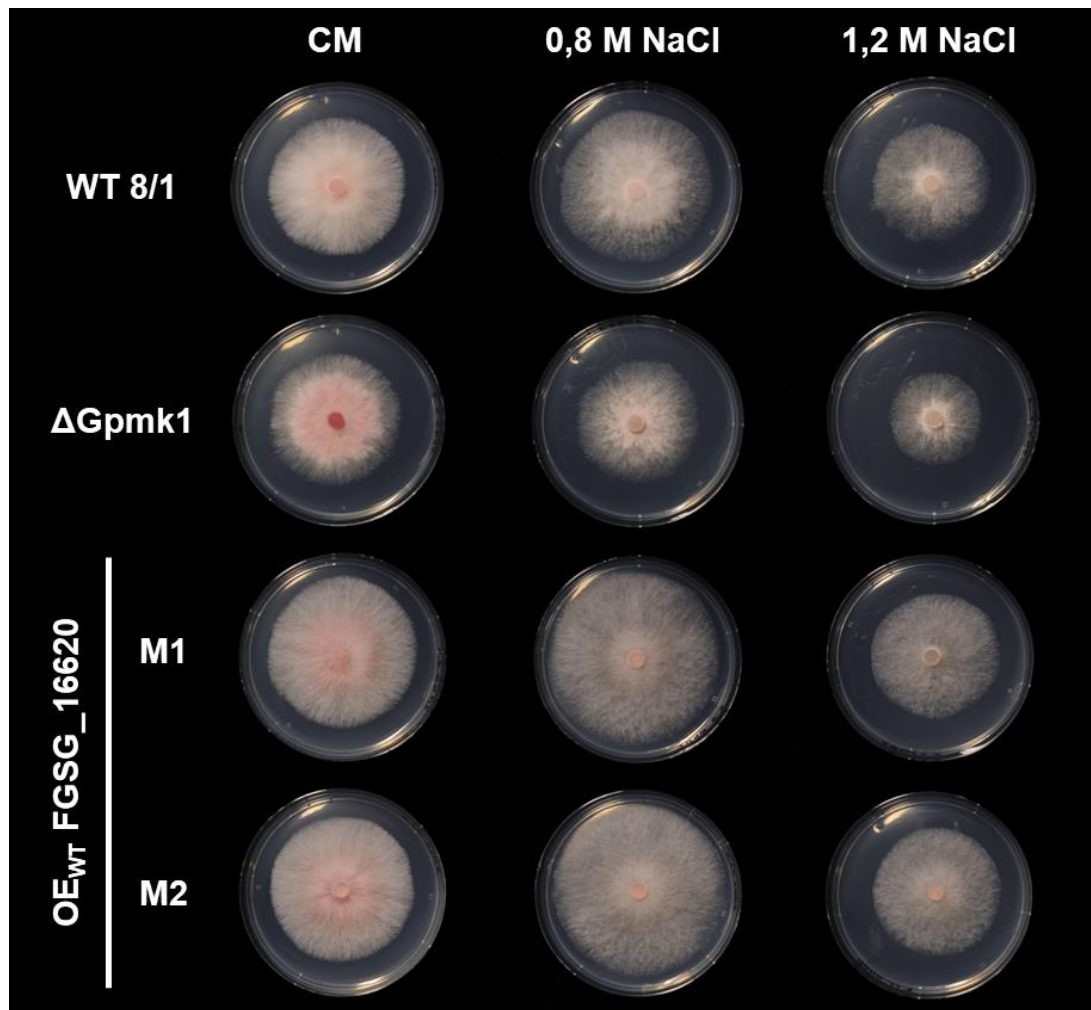


Abb. 82: Wachstum der OE_{WT} FGSG_16620 unter hyperosmotischen Bedingungen. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die Δ Gpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_16620 (M1 und M2) verwendet.

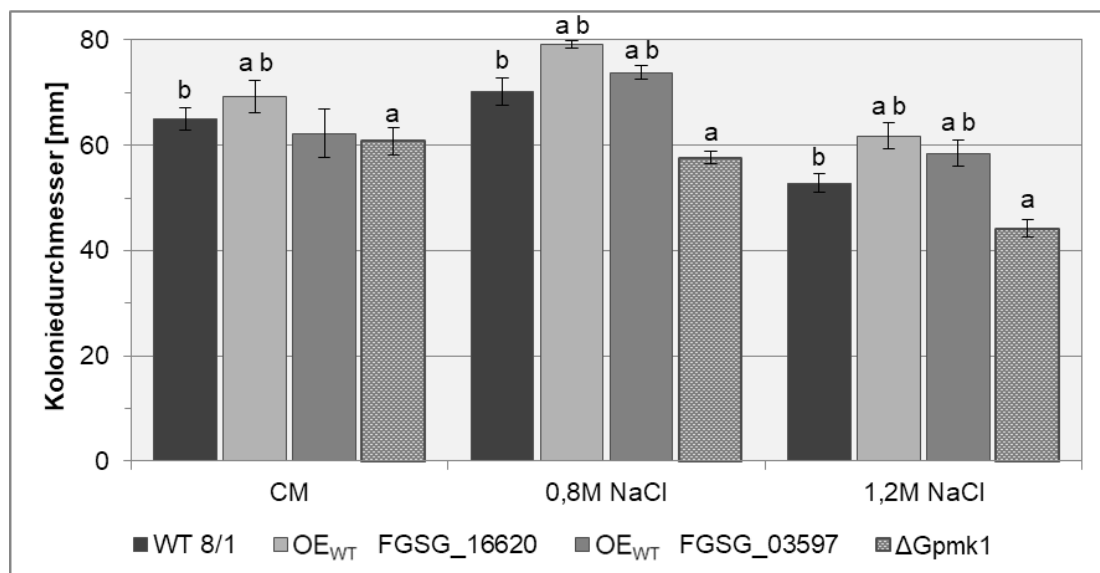


Abb. 83: Wachstum der Mutanten OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 unter hyperosmotischen Bedingungen. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 0,8 M NaCl bzw. 1,2 M NaCl gemessen (3 dpi). Es wurden jeweils 16 Replikate des Wildtyps 8/1, der Δ Gpmk1 und zwei unabhängiger Mutanten der OE_{WT} FGSG_03597 und der OE_{WT} FGSG_16620 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. Δ Gpmk1. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

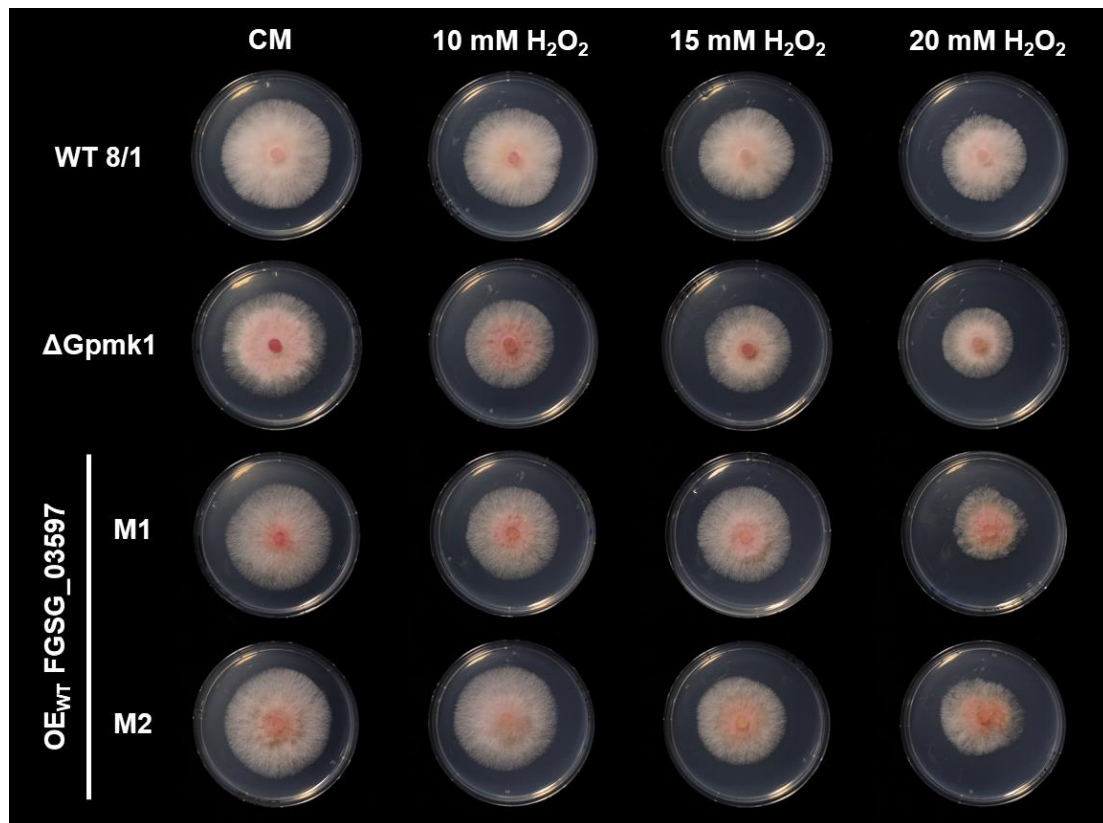


Abb. 84: Wachstum der OE_{WT} FGSG_03597 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_03597 (M1 und M2) verwendet.

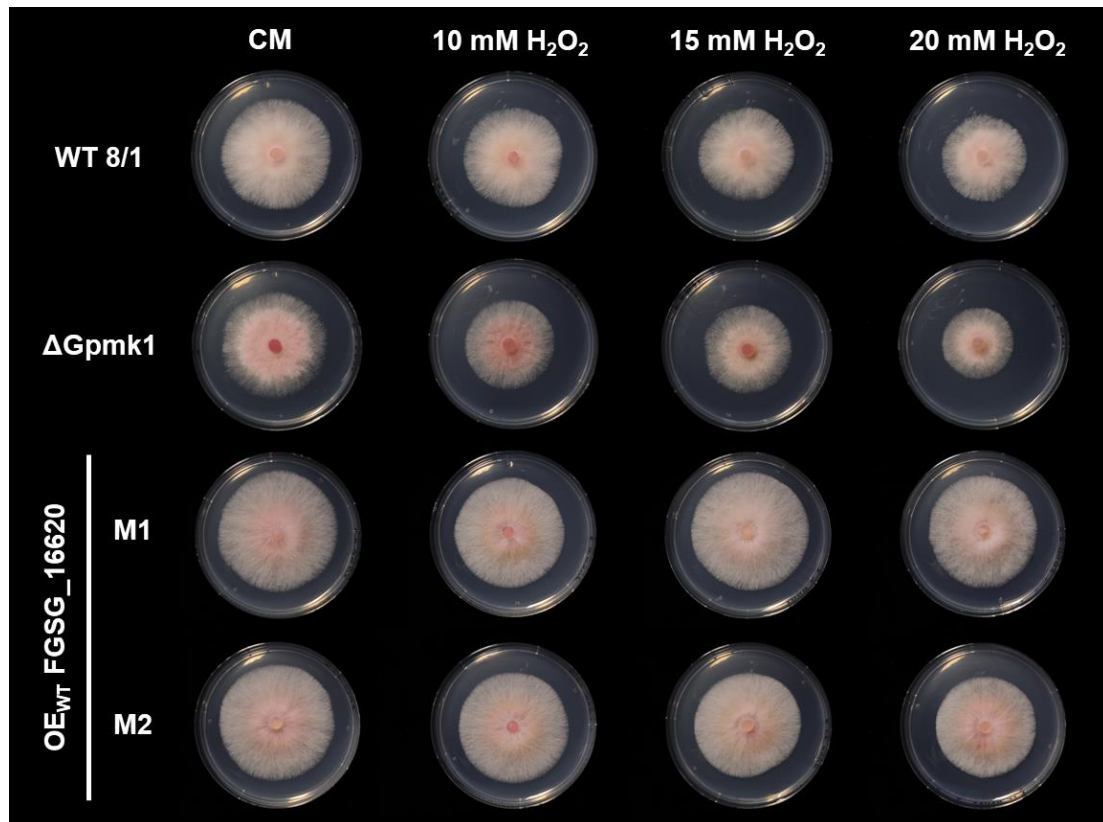


Abb. 85: Wachstum der OE_{WT} FGSG_16620 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Das Wachstum wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden der Wildtyp 8/1, die ΔGpmk1 und zwei unabhängige Mutanten der OE_{WT} FGSG_16620 (M1 und M2) verwendet.

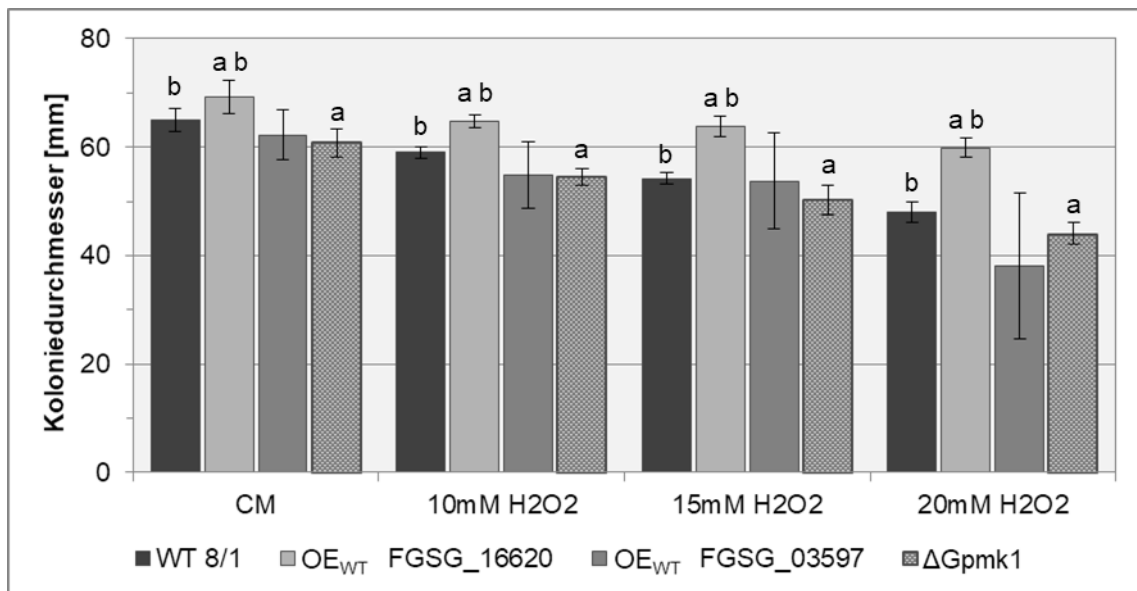


Abb. 86: Wachstum der Mutanten OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid. Der Koloniedurchmesser [mm] wurde auf CM-Festmedium ohne und mit einem Zusatz von 10 mM H₂O₂ bzw. 15 mM und 20 mM H₂O₂ untersucht (3 dpi). Es wurden jeweils 24 Replikate des Wildtyps 8/1, der ΔGpmk1 und zwei unabhängiger Mutanten der OE_{WT} FGSG_03597 und der OE_{WT} FGSG_16620 verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Post-Hoc t-Test und Bonferroni-Korrektur. a: Signifikanz ggb. Wildtyp 8/1, b: Signifikanz ggb. ΔGpmk1. $p^{a,b} \leq 0,00833$.

3.4.4.1.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies während des Wachstums der OE_{WT} FGSG_03597 und OE_{WT} FGSG_16620

Zur Betrachtung des generellen Oxidationszustands der Überexpressionsmutanten der Gene FGSG_03597 und FGSG_16620 im Wildtyp 8/1 wurde während der Wachstumsphase auf CM-Festmedium eine Färbung zur Detektion von ROS mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) durchgeführt. Dieser Farbstoff reagiert mit Superoxid (O_2^-) und bildet so eine blaue Färbung aus. Die Intensität dieser Färbung korreliert mit der Konzentration des vorhandenen Superoxids (2.2.19).

Der Wildtyp 8/1 und die ΔGpmk1 wiesen beide einen deutlichen blaugefärbten Ring am Rand der Kolonie auf. Das Myzel beider Stämme war generell leicht blau gefärbt. Nur das ältere Myzel im Zentrum der Kolonie der ΔGpmk1 zeigte eine Färbung in höherer Intensität. Das natürlich von *F. graminearum* gebildete Aurofusarin führte zu einer sichtbaren roten Färbung der Kolonien. Dieser Farbstoff steht in keinem Zusammenhang mit der Detektion von ROS und der Färbung mit NBT (Abb. 87).

Der Oxidationszustand der Mutante OE_{WT} FGSG_03597 unterschied sich wesentlich von dem des Wildtyps 8/1 und der ΔGpmk1. Die Kolonie der OE_{WT} FGSG_03597 zeigte nur eine sehr schwache blaue Färbung des Myzels. Auch war kein Ring im äußeren Bereich der Kolonie zu erkennen. Das Myzel der Mutante schien sich demnach in einem signifikant geringeren Grad der allgemeinen Oxidation zu befinden und auch keine verstärkte Konzentration von ROS in den Wachstumszonen zu besitzen (Abb. 87).

Die Überexpressionsmutante OE_{WT} FGSG_16620 zeigte eine im Vergleich zu den Referenzstämmen etwas schwächere blaue Färbung des Myzels. Auch der äußere angefärbte Ring war wesentlich kleiner und von geringerer Intensität. Demnach befindet sich die Mutante OE_{WT} FGSG_16620 generell und im frischen Myzel der Randbereiche in einem geringeren Oxidationszustand als der Wildtyp 8/1 oder die Δ Gpmk1 (Abb. 87).

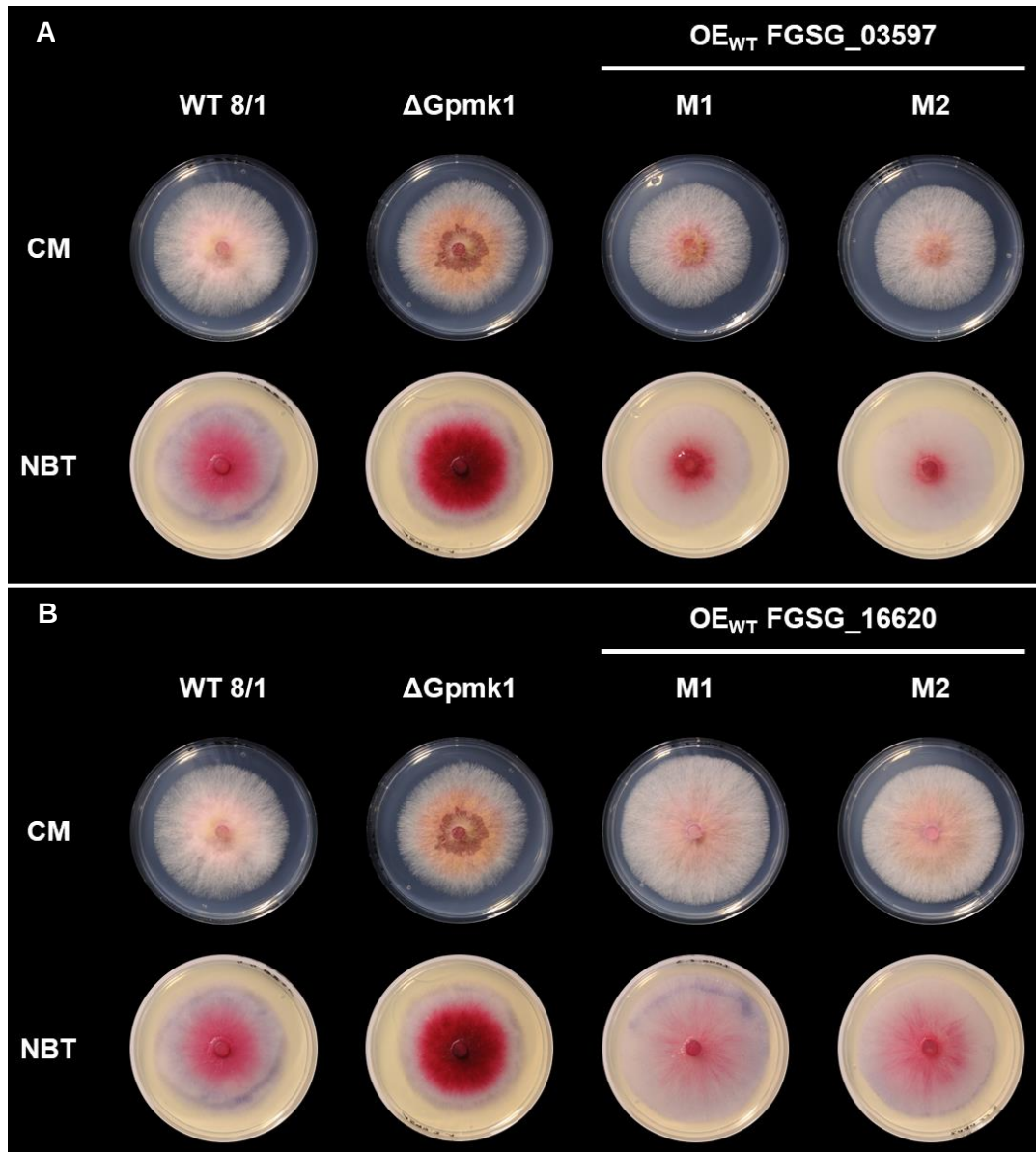


Abb. 87: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Der Oxidationszustand des Pilzes wurde nach Wachstum auf CM-Festmedium (3 dpi) durch Färbung mit NBT untersucht. Es wurden jeweils drei biologische Replikate des Wildtyps 8/1, der Δ Gpmk1 und jeweils zwei unabhängiger Mutanten der OE_{WT} FGSG_03597 (**A**) und der OE_{WT} FGSG_16620 (**B**) verwendet. CM: Unbehandelte Kolonie, NBT: Gefärbte Kolonie (dunkelblaue Färbung).

3.4.4.1.6 Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Infektion von Weizenpaleae durch die OE_{WT} FGSG_03597

Um eine Weizenähre erfolgreich infizieren zu können, muss *F. graminearum* Strukturen zur Infektion auf der Pflanzenoberfläche bilden. Ob die Hypervirulenz der Überexpressionsmutante des Gens FGSG_03597 im Wildtyp 8/1 auf dem Weizenkultivar 'Amaretto' (3.4.4.1.2) eine Veränderung in der Formierung von Infektionsstrukturen auf Weizenpaleae zu Grunde liegt, wurde mittels CLSM fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden Palea des Kultivars 'Nandu' mit dem Wildtyp 8/1 und der Mutante OE_{WT} FGSG_03597 inokuliert und nach sieben Tagen mit dem Fluoreszenzfarbstoff WGA-CFTM488A angefärbt (2.2.21)

Auf der Oberfläche der Palea bildete der Wildtyp 8/1 ein Netzwerk aus Laufhyphen mit räumlich begrenzten Ansammlungen von Infektionsstrukturen und vereinzelt auftretenden Infektionskissen (Abb. 88). Die Aggregationen bestanden aus Infektionsstrukturen, wie gelappten Appressorien und Infektionskissen, und hatten eine durchschnittliche Größe von etwa 100 bis 200 µm (Abb. 88A-B). Die individuell stehenden Infektionskissen hatten im Allgemeinen eine Breite von etwa 20 µm und waren Ausgangspunkt mehrerer interzellulär im Pflanzengewewe wachsenden Hyphen (Abb. 88C-F).

Die Mutante OE_{WT} FGSG_03597 formte auf der Pflanzenoberfläche ebenfalls ein Netzwerk aus Laufhyphen, welches allerdings dichter und kompakter war als beim Wildtyp 8/1. In manchen Bereichen war die Frequenz der gebildeten Infektionsstrukturen so gesteigert, dass diese eine große Fläche bildeten (Abb. 89A). Die im Wildtyp 8/1 auftretenden Aggregationen von Infektionsstrukturen konnten auch bei der OE_{WT} FGSG_03597 beobachtet werden. Diese waren allerdings kompakter und stärker verzweigt (Abb. 89B). Die von der Mutante gebildeten Infektionskissen waren mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 150 µm wesentlich größer als die vom Wildtyp 8/1. Von ihrer Erscheinung wirkten diese Infektionskissen stärker verzweigt und verknäult als beim Wildtyp 8/1 (Abb. 89C,E,F). Auch von der Mutante gebildete gelappte Appressorien waren stark vergrößert. Ihre Länge war von etwa 25 µm beim Wildtyp 8/1 auf bis zu 350 µm bei der OE_{WT} FGSG_03597 angestiegen (Abb. 89D).

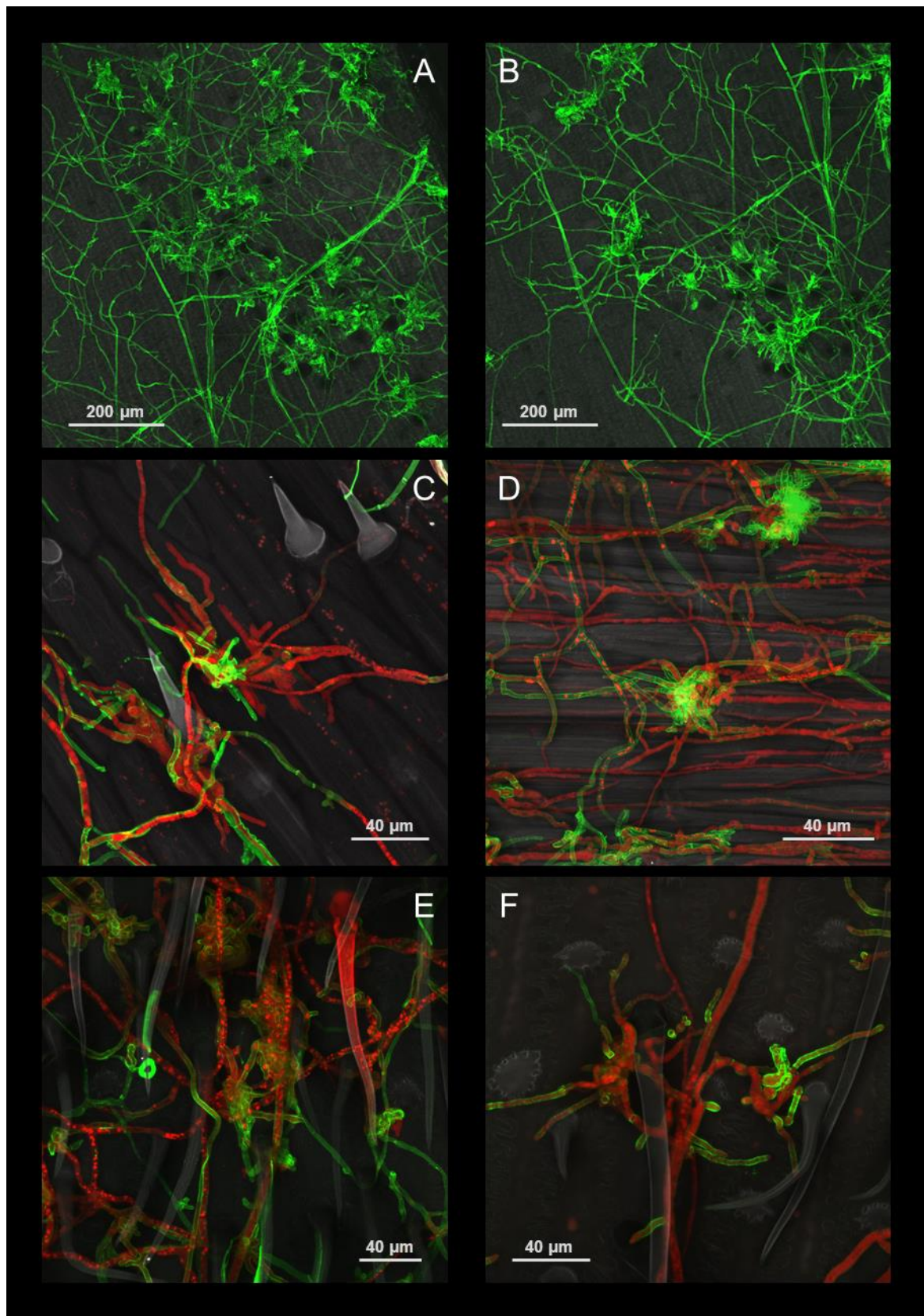


Abb. 88: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch den Wildtyp 8/1 (7 dpi). Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der Oberfläche von Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu'. **A+B:** Übersichtsaufnahme des Laufhyphennetzwerks und gebildeter Infektionsstrukturen. **C-F:** Infektionskissen von *F. graminearum*. Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz des mit WGA-CF™488A gefärbten Chitins (grün), Fluoreszenz eines konstitutiv und zytoplasmatisch exprimierten DsRed (rot). Maßstab: 200 µm bzw. 40 µm.

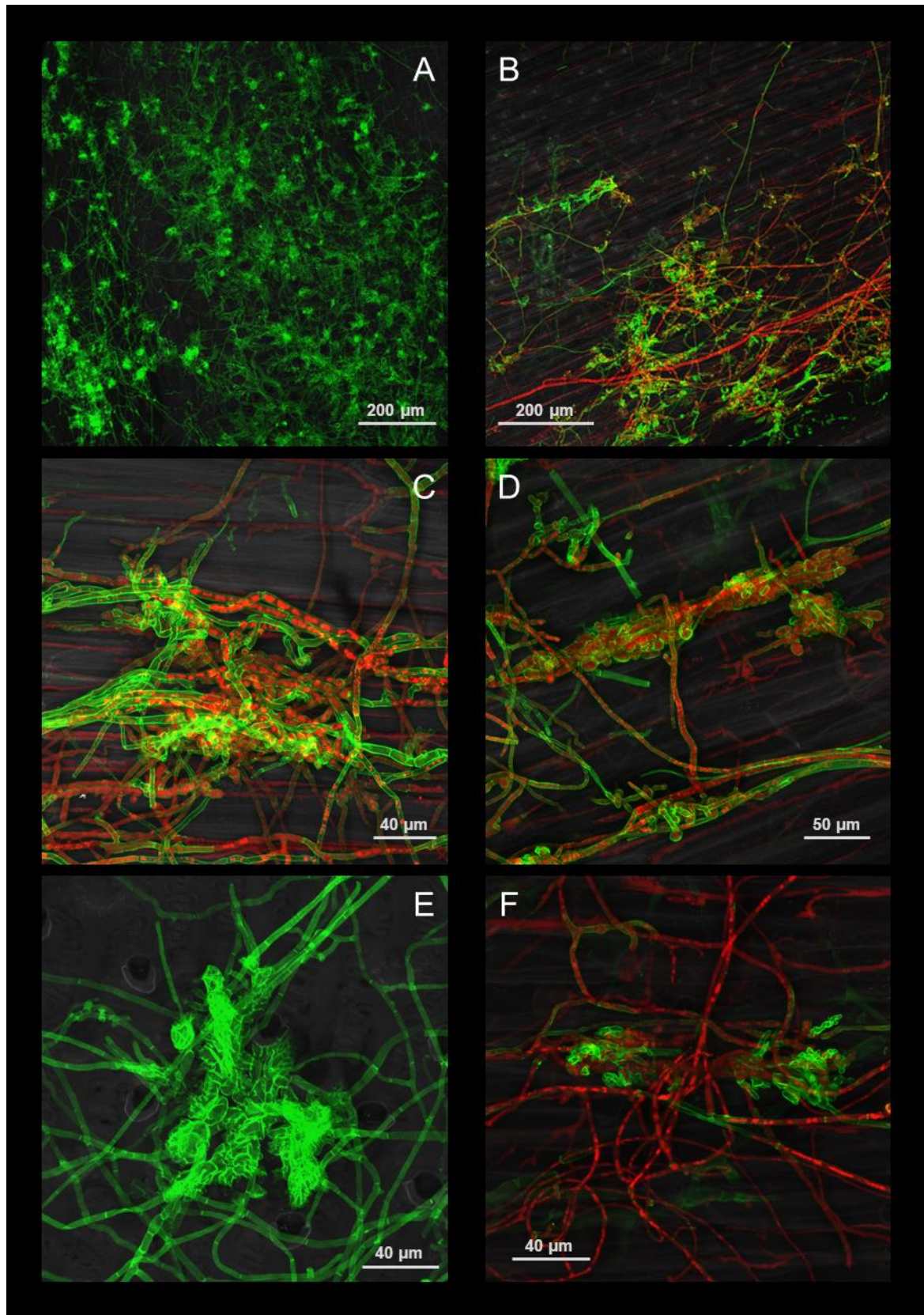


Abb. 89: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch die OE_{WT} FGSG_03597 (7 dpi). Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der Oberfläche von Weizenpaleae des Kultivars 'Nandu'. **A+B:** Übersichtsaufnahme des Laufhyphennetzwerks und in Flächen gebildeter Infektionsstrukturen. **C+F:** Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 stark vergrößerte und verzweigte Infektionsstrukturen der OE_{WT} FGSG_03597. Autofluoreszenz der Pflanze (grau), Fluoreszenz des mit WGA-CFTM488A gefärbten Chitins (grün), Fluoreszenz eines konstitutiv und zytoplasmatisch exprimierten DsRed (rot). Maßstab: 200 μm, 50 μm bzw. 40 μm.

4. Diskussion

4.1 Auswertung der Transkriptom-Daten des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1

4.1.1 Numerische Analyse der Transkriptom-Daten

4.1.1.1 Einführung und generelle Expression der Gene

Die Erstellung genomweiter Transkriptionsprofile verschiedener Strukturen oder zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung phytopathogener Pilze ist eine gängige Methode zur grundlegenden Analyse des Infektionsprozesses. Anhand dieser Transkriptome konnten transkriptionelle Unterschiede identifiziert und relativ zwischen zwei Vergleichspartnern quantifiziert werden.

In dieser Arbeit sollte die Regulation der Gene des phytopathogenen Ascomyceten *F. graminearum* während der frühen Infektionsphase auf Weizen untersucht werden. Dabei wurde der *F. graminearum* Wildtyp 8/1 und die Deletionsmutante der *Gibberella* Pathogenitäts-MAP-Kinase Gpmk1 betrachtet und verglichen.

Die Ausschaltung der Gpmk1 führt in *F. graminearum* zu einem vollständigen Verlust der Pathogenität auf Weizen (Jenczmionka et al., 2003; Urban et al., 2003). Des Weiteren ist die Δ Gpmk1 nur zu einem subcuticulären Wachstum auf der Oberfläche von Weizenblüten fähig und kann mit gebildeten Infektionskissen die Wirtspflanze nicht penetrieren (Boenisch, 2013). Neben einigen weiteren Bereichen ist der Wildtyp 8/1 nach einer Deletion der Gpmk1 beispielsweise nicht mehr in der Lage das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) auf Weizen zu bilden (Jenczmionka, 2004).

Aufgrund dieser und weiterer Phänotypen wurden in dieser Arbeit Transkriptome von drei verschiedenen Zelltypen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 erstellt und untersucht. Hierfür wurde von den beiden Stämmen jeweils Material einer axenischen Myzelkultur sowie von Laufhyphen und Infektionskissen, welche mittels LCM von der Oberfläche einer Weizen-Palea isoliert wurden, für die Erstellung der ds cDNA-Banken gesammelt. Diese Banken wurden sequenziert und auf das Referenzgenom von *F. graminearum* PH-1 zugeordnet. Die anschließende bioinformatische Auswertung gab Aufschluss über die Regulation der insgesamt 13826 Gene des Genoms von *F. graminearum*.

Für den Wildtyp 8/1 wurde gezeigt, dass die Anzahl der generell transkribierten Gene ausgehend vom Myzel über die Laufhyphen bis in die Infektionskissen zunimmt. In der Δ Gpmk1 war die Zahl der transkribierten Gene im Myzel und den Laufhyphen nahezu identisch. In den Infektionskissen wurden die meisten Gene transkribiert, womit das Niveau des Wildtyps 8/1 erreicht wurde. Durchschnittlich sind im Wildtyp 8/1 Transkripte von 12140 Genen und in der Δ Gpmk1 von 12233 Genen in den Laufhyphen und Infektionskissen detektierbar.

Laut einer Studie zur Analyse grundsätzlich exprimierter Gene in verschiedenen Wirtspflanzen werden insgesamt 10691 Gene von *F. graminearum* während der Weizeninfektion verwendet (Harris et al., 2016). Allerdings handelte es sich bei dem in dieser Studie zur Infektion verwendeten Stamm um das Isolat DAOM180378 von Maispflanzen aus Ottawa (Kanada). Diese Tatsache und, dass für die Analyse die gesamten inokulierten Ährchen verwendet wurden, könnten als Erklärung für die unterschiedliche Anzahl an Genen dienen. Tendenziell werden allerdings ähnlich viele Gene während des Infektionsprozesses transkribiert.

Bei dem Vergleich der Genexpression im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 wurde des Weiteren festgestellt, dass in beiden Stämmen grundsätzlich 75 % aller Gene transkribiert werden. Dem gegenüber stehen 618 Gene (4 %), die zu keinem Zeitpunkt exprimiert wurden. Dies zeigt Parallelen zu einer Studie mit einem Vergleich der transkribierten Gene während der Infektion von Weizen, Gerste bzw. Mais. In dieser wurde festgestellt, dass 777 Gene des *F. graminearum* Stamms DAOM180378 bei einer Infektion von Weizen nicht exprimiert werden. Dabei waren 677 Gene allein auf Gerste und 63 Gene ausschließlich auf Mais transkribiert; 37 Gene wurden exklusiv auf Gerste und Mais exprimiert (Harris et al., 2016).

Die Transkription der übrigen Gene (21 %) bei der Analyse des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 ist abhängig vom Zelltyp und dem jeweiligen Stamm. Dies verdeutlicht die Anpassung der Genregulation während des Wachstums auf der Pflanze im Vergleich zum Wachstum in künstlichem Medium und der morphologischen Entwicklung von Laufhyphen zu Infektionskissen. Es zeigt zudem auch, dass diese Regulation durch die Mutation in der Δ Gpmk1 in gewissem Maß gestört ist. Dies äußert sich auch darin, dass 158 Genen durch die Deletion der Gpmk1 nicht mehr transkribiert werden. Allerdings stehen diesen insgesamt 274 Gene gegenüber, die exklusiv in den Zellen der Δ Gpmk1 exprimiert werden.

Bei der vergleichenden Analyse der Transkription in den drei Zellvarianten eines Stamms wurde deutlich, dass der wesentliche Teil der Gene im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 nicht differentiell zwischen Myzel, Laufhyphen oder Infektionskissen reguliert wird. Der Anteil differentiell exprimierter Gene ist in den Laufhyphen und Infektionskissen der Δ Gpmk1 geringfügig höher als im Wildtyp 8/1. Allgemein zeigte sich, dass die Gene in den Laufhyphen und Infektionskissen ähnlicher reguliert werden als in einem Vergleich der beiden Zelltypen mit dem Myzel.

4.1.1.2 Pflanzen-regulierte Expression (NPR, PR, PI)

Durch die unterschiedliche Regulation der Gene im Myzel und in den auf der Pflanze gebildeten Zellen konnte das Expressionsverhalten dieser Gene während der Infektion der Wirtspflanze untersucht werden. Die Gene wurden anhand ihrer Transkription in drei Kategorien eingeteilt: Gene mit unveränderter Regulation auf Pflanzengewebe (NPR), pflanzen-reprimierte (PR) und pflanzen-induzierte Gene (PI).

Es zeigte sich, dass sowohl im Wildtyp 8/1 als auch in der Δ Gpmk1 der größte Teil zu den NPR zählt (je etwa 80 %, etwa 11000 Gene). Die restlichen Gene werden in beiden Stämmen zu 8 % (etwa 1100 Gene) auf der Pflanze reprimiert bzw. zu etwa 13 % (1832 Gene) im Wildtyp 8/1 und 12 % (1570 Gene) in der Δ Gpmk1 auf der Pflanze verstärkt exprimiert. Damit ist der Anteil der PI in beiden Stämmen etwa um ein Drittel größer als der Anteil der PR. Werden die absoluten Zahlen der jeweils regulierten Gene betrachtet, unterscheiden sich der Wildtyp 8/1 und die Δ Gpmk1 in den PR um 19 Gene, die entsprechend in der Δ Gpmk1 reguliert werden. Durch die Pflanze induziert, werden im Wildtyp 8/1 hingegen 262 Gene mehr transkribiert.

In einer Studie der Transkription von Genen des *F. graminearum* Stamms PH-1 während der Infektion von Weizen des Kultivars 'Bobwhite' wurde die Anzahl der Gene mit einer erhöhten oder verminderten Menge an Transkript bestimmt. Dabei war die Transkript-Häufigkeit aus allen 13826 Genen des Genoms bei 3591 Genen (26 %) auf der Pflanze und bei 5629 Genen (40 %) in einer Myzelkultur erhöht (Brown et al., 2017). Ob diese Angaben allerdings gänzlich mit der Definition der pflanzen-regulierten Gene in dieser Arbeit vereinbar sind, bleibt aufgrund der vagen Bezeichnung in der Studie unklar. Zusätzlich wurde in der Studie ein unterschiedlicher Pilzstamm und ein anderes Weizenkultivar verwendet. Dies könnte diese erheblichen Differenzen erklären.

Auf dem Weizenkultivar 'Remus' werden im *F. graminearum* Wildtyp PH-1 im Vergleich zu einer Myzelkultur auf einem Minimal-Festmedium mit einem Zusatz der DON-Synthese-induzierenden Stickstoffquelle L-Ornithin 786 Gene (6 %) sowohl pflanzen-induziert als auch pflanzen-reprimiert (Boedi et al., 2016). Da in der Studie ein supplementiertes festes Minimalmedium statt eines flüssigen Vollmediums zur Anzucht des Myzels verwendet wurde, könnte dies die geringere Zahl der induzierten bzw. reprimierten Gene erklären.

Während der Infektion des Rhizoms junger Weizenpflanzen des Kultivars 'Kennedy' durch den *F. graminearum* Wildtyp CS3005 wurden zwei bzw. vierzehn Tage nach der Inokulation durchschnittlich etwa 1652 Gene (12 %) gegenüber einer Myzelkultur induziert und 1895 Gene (14 %) im Vergleich zur Kultur reprimiert (Stephens et al., 2008). Tendenziell sind diese Werte mit denen der Ähreninfektion durch den Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 vergleichbar. Die Abweichungen lassen sich durch die sich stark unterscheidenden Infektionsbereiche erklären.

Während einer Infektion von Gerste durch den *F. graminearum* Wildtyp NRRL 31084 werden im Vergleich zum Wachstum in künstlichem Medium unter Mangelbedingungen ohne Stickstoff oder Kohlenstoff 978 Gene (7 %) auf der Pflanze induziert. Allerdings werden im Vergleich zu dem Wachstum in den Medien mit Kohlenstoffmangel 4421 Gene (32 %) und bei Stickstoffmangel 3948 Gene (29 %) auf der Pflanze reprimiert. Von diesen Genen werden 3368 Gene (24 %) unter beiden Mangelbedingungen im Medium stärker im Myzel transkribiert (Güldener et al., 2006).

Aufgrund des starken Einflusses der Mangelmedien auf die Genexpression des Pilzes und durch den Vergleich der Transkription während der Infektion von Gerste können die teils erheblichen Unterschiede der regulierten Gene zu den in dieser Arbeit ermittelten Werten erklärt werden.

Eine Untersuchung der pflanzen-regulierten Gene während der Infektion von Mais zeigte, dass auf der Pflanze im Vergleich zu einer Myzelkultur insgesamt 1848 Gene (13 %) induziert und 2160 Gene (15 %) reprimiert werden (Zhang et al., 2012). Diese Werte liegen tendenziell in der Reichweite der in dieser Arbeit erfassten Anzahl regulierter Gene. Da während der Infektion von Mais allerdings insgesamt wesentlich weniger Gene von *F. graminearum* transkribiert werden (Harris et al., 2016), lässt sich der erhöhte Anteil an pflanzen-reprimierten Genen in der Studie erklären.

Bei einem Vergleich der Transkriptionsmuster in Bezug auf eine Induktion oder Repression auf der Pflanze im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 zeigen jedoch nur 79 % aller Gene in beiden Stämmen die gleiche Regulationstendenz. Nur 50 % der PI sind sowohl im Wildtyp 8/1 als auch der Δ Gpmk1 entsprechend reguliert. In den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und den Laufhyphen der Δ Gpmk1 sind Gengruppen vorhanden, die deutlich stärker transkribiert werden, als in dem Zelltyp des jeweiligen Vergleichspartners.

Der Anteil der PR in beiden Stämmen ist mit 37 % sogar noch geringer als bei den PI. Dies äußert sich in kleinen Gruppen von Genen, die im jeweils anderen Vergleichspartner im Myzel stärker exprimiert werden.

Dennoch wird insgesamt nur ein sehr geringer Teil aller Gene (171 Gene, 1,5 %) in den beiden Stämmen unter gegensätzlichen Bedingungen transkribiert. Im Wildtyp 8/1 zählen 102 Gene zu den PI und in der Δ Gpmk1 zu den PR. Davon sind 55 % im Myzel der Δ Gpmk1 generell am stärksten exprimiert.

4.1.1.3 DEG im Wildtyp 8/1 und in der Δ Gpmk1 sowie deren Vergleich

Ausgehend von den durch die Pflanze regulierten Genen, wurden die auf der Pflanze gebildeten Strukturen, die Laufhyphen und Infektionskissen, des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 miteinander verglichen. Dabei wurden differentiell regulierte Gene (DEG) identifiziert und erfasst.

Bei individueller Betrachtung des Wildtyps 8/1 und den gebildeten Strukturen, wurden insgesamt 640 Gene unterschiedlich in den beiden Zelltypen reguliert. Davon waren 147 Gene in den Laufhyphen und 493 Gene in den Infektionskissen hochreguliert. Das Transkriptionsmuster dieser Gene verdeutlicht, dass die am stärksten in den Infektionskissen hochregulierten Gene deutlich stärker transkribiert wurden als die Gene mit der höchsten Expression in den Laufhyphen.

In den Strukturen der Δ Gpmk1 sind insgesamt 906 Gene differentiell reguliert. In den Laufhyphen waren davon 374 Gene und in den Infektionskissen 532 Gene hochreguliert.

Wird die individuelle Regulation der Gene im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 verglichen, zeigt sich demnach, dass mehr als das 2,5-fache an Genen in den Laufhyphen stärker transkribiert werden als in den zugehörigen Infektionskissen. Die Anzahl der in den Infektionskissen höher regulierten Gene ist bei beiden Stämmen tendenziell vergleichbar. Sowohl in den Laufhyphen als auch den Infektionskissen ist jedoch nur ein geringer Anteil der regulierten Gene in beiden Stämmen identisch transkribiert. Gemeinsam in den Laufhyphen beider Stämme sind nur 21 Gene und in den Infektionskissen nur 89 Gene hochreguliert. Allerdings weisen von den übrigen Genen nur wenige eine entgegengesetzte Regulation auf. In den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 bzw. den Infektionskissen der Δ Gpmk1 sind 6 Gene hochreguliert und in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und den Laufhyphen der Δ Gpmk1 43 Gene.

Dies unterstreicht die angenommene Variabilität der Genexpression, welche durch die Deletion der Gpmk1 ausgelöst wird. Das zeigt allerdings auch, dass die Apathogenität der Δ Gpmk1 mit einer größeren Wahrscheinlichkeit durch die nicht ausreichende Transkription benötigter Gene in den Laufhyphen und Infektionsstrukturen verursacht wird, als durch die verstärkte Expression von Genen, die eine Avirulenz aktiv auslösen.

Ersteres kann beispielsweise zu dem bekannten Phänotyp führen, dass die vollständig entwickelten Infektionsstrukturen der Δ Gpmk1 die Zelloberfläche der Wirtspflanze nicht penetrieren können (Boenisch, 2013), da benötigte Zellwand-abbauende Enzyme nicht exprimiert werden könnten. Es kann aber auch dazu führen, dass die Produktion des Mykotoxins DON in der Δ Gpmk1 möglicherweise aufgrund des fehlenden Schlüssel-Enzyms oder fehlender Expression der Regulatoren des Sekundärmetabolit-Clusters nicht durchgeführt wird (Jenczmionka, 2004; Maier et al., 2006; Seong et al., 2009). Dennoch kann eine aktiv ausgelöste Avirulenz nicht vollständig ausgeschlossen werden, da beispielsweise eine fehlerhafte Regulation von Effektorproteinen die Erkennung des Pilzes durch die Wirtspflanze und somit eine verfrühte Abwehrreaktion auslösen könnte. Die Auswirkung der Expression von Effektoren wurde bereits für verschiedene pathogene Pilze gezeigt (Djamei et al., 2011; Kleemann et al., 2012; Mentlak et al., 2012; Lu & Edwards, 2016; Ghareeb et al., 2019; Misas Villamil et al., 2019).

In einem direkten Vergleich der beiden auf der Pflanze gebildeten Strukturen des Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 konnten 1234 DEG in den Laufhyphen und 872 DEG in den Infektionskissen identifiziert werden. Das Expressionsmuster dieser Gene zeigte, dass das Verhältnis der hoch- bzw. herunterregulierten Gene in den jeweiligen Zelltypen tendenziell gleich ist. Dies wird von den absoluten Zahlen der regulierten Gene gestützt. In den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 waren 560 Gene und in denen der Δ Gpmk1 674 Gene hochreguliert.

Die Transkription war in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 bei 532 Genen und in denen der Δ Gpmk1 bei 340 Genen höher als im jeweils anderen Stamm. Die übrigen Gene und somit der größte Anteil (91 % in den Laufhyphen, 94 % in den Infektionskissen) war nicht differentiell reguliert.

4.2 Funktionelle Kategorisierung der DEG in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1

Im Vergleich der funktionellen Eigenschaften der DEG im Myzel, den Laufhyphen und den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 konnte gezeigt werden, dass insgesamt sieben Kategorien von Proteinfunktionen in mindestens einem der verschiedenen Zelltypen eines Stamms prominent hochreguliert werden.

Diese Kategorien lassen sich funktionsunabhängig in nicht-sekretierte (non SP) und sekretierte Proteine (SP) unterteilen. Somit wurde gezeigt, dass nicht-sekretierte hochregulierte Proteine größtenteils eine Funktion als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Dehydrogenasen (DH), Transporterproteine (TP), Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE) oder Transkriptionsfaktoren (TF) einnehmen. Sekretierte Proteine stammen hingegen verstärkt aus den funktionellen Kategorien der putativen Effektorproteine (PE), kohlenhydrataktiven Enzyme (CAZy) oder der Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE). Unabhängig von der funktioneller Kategorie und der Sekretionseigenschaft werden diverse Gene aus Sekundärmetabolit-Clustern in allen Zelltypen beider Stämme hochreguliert.

4.2.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Der Vergleich der Regulation der 130 Gene, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren codieren, zeigte, dass im Wildtyp 8/1 etwa 26 % und in der Δ Gpmk1 20 % aller Gene dieser Kategorie während der Infektion von Weizen verstärkt transkribiert werden. Dabei zeigte das Expressionsmuster deutliche Auffälligkeiten. Etwa 10 % der Gene waren in den Infektionskissen und Laufhyphen der Δ Gpmk1 deutlich gegenüber dem Myzel der Δ Gpmk1 sowie allen drei Zelltypen des Wildtyps 8/1 herunterreguliert. Zudem waren etwa 19 % der Gene nahezu ausschließlich im Myzel der beiden Stämme verstärkt exprimiert. Zwei weitere Gen-Gruppen wurden jeweils nur in den Infektionskissen eines Stammes vermehrt transkribiert. Dies verdeutlicht, dass eine durch den Stamm oder den Zelltyp bedingte Regulation der GPCR in den meisten Fällen zu einer sehr starken Änderung der Transkript-Menge führt.

Während des Infektionsprozesses des Wildtyps 8/1 werden von den 130 GPCR insgesamt 33 Gene und somit etwa 25 % im Vergleich zur Δ Gpmk1 mit 11 Genen und 8 % in einem höheren Maß transkribiert. Davon sind 20 Gene (15 %) in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 hochreguliert.

Unter den zehn am stärksten exprimierten Genen in den Infektionskissen beider Stämme sind fast ausschließlich nicht näher bestimmte integrale Membranproteine, von denen sieben im Wildtyp 8/1 und fünf in der Δ Gpmk1 eine Ähnlichkeit zu dem Transmembranrezeptor PTH11 aus *Magnaporthe oryzae* (Klasse XIV GPCR) besitzen.

Von diesem ist bekannt, dass er eine entscheidende Rolle in der Bildung von Appressorien und der Virulenz von *M. oryzae* einnimmt. Durch eine Ausschaltung des Proteins wird die Rate, mit der morphologisch funktionsfähig Appressorien gebildet werden, auf etwa 10 % reduziert. Diese Appressorien besitzen allerdings wie der Wildtyp die Fähigkeit die Oberfläche der Wirtspflanze zu penetrieren. Durch die stark reduzierte Anzahl der Invasionsstellen bleibt die Infektion der Pflanze allerdings räumlich stark eingeschränkt. Für andere Bereiche, wie der generellen Wachstumsrate oder der Reproduktion, scheint das PTH11 wiederum keine Bedeutung zu haben (DeZwaan et al., 1999).

In den phytopathogenen Pilzen *Neurospora crassa* und *Trichoderma reesei* sind GPCR der Klassen XIII und XIV in die Wahrnehmung von Cellulose und somit in die Regulation der Cellulase-Aktivität involviert (Cabrera et al., 2015; Stappler et al., 2017; Martín et al., 2019). In *N. crassa* haben diese zudem einen Einfluss auf die Myzelbildung (Cabrera et al., 2015).

Eine umfassende Studie zur Charakterisierung der Funktion von GPCR in *F. graminearum* konnte zeigen, dass von 105 ausgewählten GPCR nur fünf einen Einfluss auf die Virulenz des Pilzes auf Weizen besitzen. Diese Gene sind GIV1 bis GIV5 (FGSG_04693, FGSG_16024, FGSG_16326, FGSG_09352 und FGSG_16358) und werden verstärkt während der Pflanzeninfektion exprimiert (Jiang et al., 2019). Auch die Analyse der Transkriptom-Daten konnte zeigen, dass diese Gene auf der Pflanze hochreguliert werden und zudem vier dieser Gene zu den am stärksten differentiell regulierten GPCR in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 gehören. Dabei ist die Transkription der codierenden Gene dieser Proteine im Wildtyp 8/1 deutlich erhöht.

Die Proteine GIV1, GIV2 und GIV3 wirken sich am stärksten auf die Virulenz von *F. graminearum* aus. Der Rezeptor GIV1 beeinflusst stark die Häufigkeit sowie die Größe und Verzweigung von Infektionskissen auf Weizen. In der Deletionsmutante des GIV1 werden nur noch etwa 30 % der Infektionskissen des zur Referenz herangezogenen Wildtyps PH-1 von *F. graminearum* gebildet, welche nahezu keine Hyphenverzweigungen und nur eine sehr geringe Größe besitzen (Jiang et al., 2019). Untersuchungen haben gezeigt, dass GIV1 zur Wahrnehmung von chemischen Komponenten einer Weizenähre dient und durch dieses Signal eine Weiterleitung sowie Aktivierung von Proteinkinasen, unter anderem der Gpmk1, und der cAMP-Synthese bewirkt (Jiang et al., 2019). So führt dieses Signal auch zur Phosphorylierung der Gpmk1 und einem Transport dieser MAP-Kinase vom Zytoplasma in den Zellkern (Jiang et al., 2019). Obwohl in der Δ Gpmk1 keine Transkription des GIV1 stattfindet, ist die Mutante in der Lage Infektionskissen zu bilden. Dies deutet auf einen weiteren Mechanismus zur Wahrnehmung der Pflanze hin.

Allerdings kann so auch erklärt werden, aus welchem Grund die $\Delta Gpmk1$ keine Infektionsstrukturen auf Glumae von Weizen formt. Durch das Fehlen des GIV1 kann das entsprechende Signal auf Glumae nicht ausgelöst werden. Jedoch bleibt unklar, wie sich der Reiz auf Paleae und Glumae unterscheidet und welche Rezeptoren durch dieses Signal aktiviert werden.

Die Gene der übrigen vier Rezeptoren dieser Gruppe GIV2 bis GIV5 sind zusammen mit dem Gen des GPCR GIV6 (FGSG_05793) im Genom von *F. graminearum* in einem Cluster angeordnet (Jiang et al., 2019). Der Rezeptor GIV6 hat alleine keinen Effekt auf die Virulenz und steht damit alleine in der Gruppe der GIV-Proteine. Die weitere Charakterisierung konnte jedoch zeigen, dass die gemeinsame Deletion des GIV5 und GIV6 zu einer deutlich stärkeren Verringerung des invasiven Hyphenwachstums und somit der Virulenz führte, als eine Ausschaltung des GIV5 allein. Daher scheint GIV6 eine unterstützende Funktion der Signalwahrnehmung zu übernehmen (Jiang et al., 2019). Diese vielseitigere Funktion der GIV6, im Vergleich zu den anderen GIV-Rezeptoren, könnte begründen, warum das codierende Gen die am stärksten hochregulierte GPCR in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ ist.

Die Proteine GIV3 und insbesondere GIV2 sind Teil des regulatorischen Systems, welches das Wachstum im inneren der Wirtspflanze steuert. Sie haben beide keinen Einfluss auf die anfängliche Penetration der Pflanze, wirken sich jedoch stark auf die Ausbreitung während der Infektion aus (Jiang et al., 2019). Eine Deletion des GIV2 führt zu einer nahezu vollständigen Störung der Zell-zu-Zell-Penetration. Dies äußert sich in einer Beschränkung der Infektion auf die initial penetrierte Wirtszelle. In seltenen Fällen breitet sich die Infektion ausschließlich im interzellulären Raum weiter aus (Jiang et al., 2019). Auch der GIV2 ist in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 gegenüber der $\Delta Gpmk1$ stark hochreguliert.

Zusammengefasst findet die Transkription von fünf dieser für den Infektionsprozess entscheidenden Gene in der $\Delta Gpmk1$ nicht oder nur in sehr geringem Maß in den Infektionskissen statt. Das gemeinsame Fehlen der Rezeptoren GIV1, GIV2 und GIV6 sowie die schwache Transkription der codierenden Gene der GIV4 und GIV5 könnten einen der Hauptauslöser für die auf gelegentliches subcuticuläres Wachstum in der inokulierten Spelze beschränkte Infektion durch die $\Delta Gpmk1$ auf Weizen darstellen.

Eine Studie zur Untersuchung nicht eindeutig bestimmter GPCR in *F. graminearum* stützt die entscheidende Rolle, welche diese Transmembranrezeptoren während des Infektionsprozesses spielen (Dilks et al., 2019). Zwei GPCR codierende Gene (FGSG_07792 und FGSG_16221) konnten darin unter anderem als Virulenz-beeinflussende Faktoren identifiziert werden. Die individuelle Ausschaltung dieser Gene führte zu einer erheblichen Verlangsamung des generellen Wachstums, welche eine erfolgreiche Infektion von Weizen stark hinauszögerte. Das während der Infektion angelegte Netzwerk aus Laufhyphen der Mutanten war wesentlich spärlicher ausgeprägt.

Die Bildung der Infektionsstrukturen und die Produktion des Mykotoxins DON wurden hingegen nicht beeinflusst. Ebenso waren die Mutanten in der Lage die Pflanzenoberfläche zu penetrieren (Dilks et al., 2019). Eines dieser Gene (FGSG_07792) war im Vergleich der Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 in dieser Arbeit unter den am stärksten differentiell regulierten und damit im Wildtyp 8/1 hochregulierten Proteinen.

Die fehlende Expression dieses und ähnlicher Proteine in der Δ Gpmk1 könnte somit im Zusammenhang mit dem Phänotyp der Δ Gpmk1 stehen. Generell gelten GPCR als aktivierende Faktoren des G-Protein-Signalwegs und stehen folglich an der Spitze dieser Signalkaskade. Auch die Regulation der Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS) kann einen Einfluss auf die Funktion der GPCR haben. Die Funktion dieser Proteine besteht darin den G-Protein-Signalweg zu inaktivieren und damit sind sie direkte Antagonisten der GPCR (De Vries et al., 2000). Die Auswertung der Transkriptom-Daten zeigte auch eine differentielle Expression der RGS im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1. Die zwei RGS FgFlbA und FgFlbB (FGSG_16620 und FGSG_03597) sind verstärkt in der Δ Gpmk1 transkribiert und können somit zu einer unnatürlichen Inhibition der Signaltransduktion durch die GPCR beitragen. Diese kann wiederum einen Effekt auf die Virulenz besitzen. Für eine nähere Charakterisierung wurden beide Proteine im Wildtyp 8/1 überexprimiert (4.3.4).

4.2.2 Dehydrogenasen

Die Auswertung der Transkriptom-Daten zeigte, dass die Transkription der 251 Proteine mit einer Dehydrogenase-Aktivität während der Weizeninfektion moduliert wird. Dabei ist die Expression generell sehr extrem und zeigt viele stark hoch- bzw. herunterregulierte Gene in den drei Zelltypen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1. Von allen Dehydrogenasen in *F. graminearum* werden insgesamt etwa 23 % im Wildtyp 8/1 und 17 % in der Δ Gpmk1 auf der Pflanze erhöht exprimiert. Im Myzel der Δ Gpmk1 sind mit 32 Proteinen etwa doppelt so viele DH hochreguliert wie im Myzel des Wildtyps 8/1. Auf der Pflanze ist dieses Verhältnis hingegen umgekehrt. Im Wildtyp 8/1 werden 36 Gene für DH und in der Δ Gpmk1 nur 17 Gene verstärkt transkribiert. Insbesondere in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 ist mit 18 Genen die 3-fache Menge im Vergleich zur Δ Gpmk1 hochreguliert. Von diesen, durch die differentiell regulierten Gene codierten, Proteine werden nur vier vom Wildtyp 8/1 sekretiert, die übrigen Proteine sind nicht-sekretiert.

Von den im Vergleich zur Δ Gpmk1 in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 am stärksten transkribierten Genen werden vier Alkohol-Dehydrogenasen codiert. Auch in der Δ Gpmk1 ist das Gen einer Alkohol-Dehydrogenase unter den zehn in den Infektionskissen am stärksten exprimierten Genen. Die Bedeutung dieser Proteingruppe wurde in einer Studie mit dem Phytopathogen *F. oxysporum* untersucht. Der Aktivitätsverlust der Alkohol-Dehydrogenase Adh1 dieses Pilzes führte zu einer Störung des Kohlenstoff- und Energie-Metabolismus.

Dies äußerte sich in einem verringerten Wachstum unter sauerstoffarmen Bedingungen und der verminderten Fähigkeit alkoholische Verbindungen zu verwerten. Zudem wurde durch die Ausschaltung der *Adh1* die Infektionsgeschwindigkeit von *F. oxysporum* auf Tomatenpflanzen drastisch reduziert (Corrales Escobosa et al., 2011). Daher lässt sich eine ähnliche Funktion der Alkohol-Dehydrogenasen in *F. graminearum* in fermentativen und oxidativen Prozessen während der Infektion von Weizen nicht ausschließen.

Dehydrogenasen stehen in engem Zusammenhang mit Proteinen mit einer Verbindung zu reaktiven Sauerstoff-Spezies, wie beispielsweise Monooxygenasen (Phillips et al., 2011). Dies impliziert, dass eine veränderte Expression von Dehydrogenasen auch das empfindliche ROS-Gleichgewicht während der Infektion einer Pflanze stören könnte.

Eine weitere grundsätzliche Funktion von Dehydrogenasen ist es Kohlenstoffverbindungen, wie Cellobiose, Pektin und weitere Polysaccharide, durch Oxidation für abbauende Enzyme zugänglich zu machen (Eriksson et al., 1974; Vaaje-Kolstad et al., 2010; Tan et al., 2015). Diese Reaktion des Abbauprozesses findet bei Pilzen aller Art statt und wurde bereits in verschiedenen Basidiomyceten und Ascomyceten beschrieben (Cameron & Aust, 2001; Phillips et al., 2011; Gao et al., 2016). Auch in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ konnten unter den jeweils hochregulierten Proteinen mehrere Dehydrogenasen mit verschiedenen Kohlenstoffverbindungen als Substrat identifiziert werden. In einer Studie im *F. graminearum* Wildtyp PH-1 konnte gezeigt werden, dass die Deletion einer Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase, welche eine Pyruvat-Dehydrogenase durch Phosphorylierung inhibiert, massive Defekte auslöst. Unter anderem führte die resultierende erhöhte Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase zu vermindertem Wachstum, Defekten in der sexuellen und asexuellen Reproduktion, verstärkter Pigmentierung des Myzels sowie einer verminderten DON-Produktion und stark verringerten Virulenz auf Weizen (Kultivar 'Yangmai Nr. 49') (Gao et al., 2016). Dies verdeutlicht die entscheidende Rolle, welche Dehydrogenasen während des Infektionsprozesses einnehmen können, und den potentiellen Effekt einer Deregulation dieser Proteine in der $\Delta Gpmk1$.

4.2.3 Transporterproteine

Die Analyse der Expression der 679 Gene, welche Transporterproteine codieren, zeigte, dass die Transkription von 18 % im Wildtyp 8/1 und 22 % in der $\Delta Gpmk1$ dieser Gene während der Infektion von Weizen induziert werden. Bei einem direkten Vergleich der beiden Stämme wurden 78 Gene (12 %) identifiziert, die gegenüber der $\Delta Gpmk1$ im Wildtyp 8/1 hochreguliert sind. In der $\Delta Gpmk1$ waren hingegen 109 Gene (16 %) stärker transkribiert als im Wildtyp 8/1. Dabei war der relative Anteil der hochregulierten Gene bei beiden Stämmen in den Laufhyphen höher als in den Infektionskissen.

Unter den am stärksten transkribierten Transporterproteinen im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 sind viele verschiedene Transporter für unterschiedliche Substrate, wie Zucker, Peptide oder Aminosäuren.

Im Wildtyp 8/1 werden unter anderem zwei Hexose-Transporter (FGSG_03144 und FGSG_05042), von denen einer eine Ähnlichkeit zu dem Transporter HXT3 aus *S. cerevisiae* aufweist, verstärkt transkribiert. Diese ermöglichen den Transport von Zuckern, wie Glukose, Fruktose oder Hexose durch die Plasmamembran mittels erleichterter Diffusion (Maier et al., 2002; Díaz-Hellín et al., 2016). In *F. oxysporum* sind Hexose-Transporter ein wichtiger Bestandteil der Ethanol-Gewinnung durch Biokonversion aus Lignocellulosehaltigem Pflanzenmaterial, Glukose oder Xylose. Ihre Expression wird dabei durch die vorhandene Konzentration von Glukose negativ reguliert, was eine hohe Affinität gegenüber Glukose impliziert. Ebenso beeinflusst die Expression der Hexose-Transporter die Transkriptionsstärke anderer Transporter von verschiedenen Zuckern (Ali et al., 2012, 2013). In *F. verticillioides* besitzt der Hexose-Transporter Fst1 eine entscheidende Rolle in verschiedenen Prozessen. Eine Deletion des codierenden Gens führt im Vergleich zu einem unveränderten Wildtyp zu einer deutlich verringerten Infektion auf verwundeten Maiskörnern. Zudem bildet die Mutante nur 10 % der Konidien und ist anfälliger gegenüber oxidativem Stress durch H_2O_2 . Die Ausschaltung des Transporters beeinflusst außerdem die Regulation von insgesamt 2677 Genen beim Wachstum auf autoklavierten Maiskörnern. Das codierende Gen von Fst1 wird während der Infektion von Körnern der Maispflanze verstärkt exprimiert (Kim & Woloshuk, 2011; Niu et al., 2015, 2017). Auch im *F. graminearum* Wildtyp 8/1 wird die Transkription des Fst1-ähnlichen Transporters (FGSG_03168) während der Weizeninfektion induziert. Im Gegensatz dazu wird das codierende Gen dieses Transporters in der Δ Gpmk1 auf der Pflanze reprimiert. Demnach könnte dieses Transporterprotein auch eine Rolle im Infektionsprozess von *F. graminearum* auf Weizen einnehmen und einen Anteil an der Ursache des Phänotyps der Δ Gpmk1 haben.

In der Δ Gpmk1 werden mehrere Major-Facilitator-Proteine verstärkt exprimiert. Einer dieser Transporter ist das Protein AurT (FGSG_02322) aus dem Sekundärmetabolit-Cluster der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Biosynthese (C13). Dieser ist verantwortlich für die Sekretion des gebildeten Pigments. Allerdings steht auch die Rate, mit der Aurofusarin gebildet wird, in einem direkten Zusammenhang mit der Expressionsstärke des AurT. Eine Ausschaltung führt zu einer deutlich verringerten Synthese des Farbstoffs (Frandsen et al., 2011). Auf der Pflanze ist AurT in der Δ Gpmk1 das am stärksten transkribierte Gen des gesamten Clusters. Aufgrund seiner regulativen Funktion könnte diese Efflux-Pumpe demnach der Auslöser für die deutlich verstärkte Pigmentierung durch die Überproduktion von Aurofusarin in der Mutante sein. Zudem wird Aurofusarin von *F. graminearum* zur Bekämpfung und somit zur Interaktion mit anderen Mikroorganismen und der Umgebung eingesetzt (Malz, 2004; Glasenapp, 2017).

Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, ob eine deutlich erhöhte Produktion und Sekretion einen Effekt auf die Wirtspflanze haben könnte. Die Sekundärmetabolite Rubrofusarin und Culmorin, mit denen sich Aurofusarin die antimikrobielle Funktion sowie chemische Eigenschaften teilt (Pedersen & Miller, 1999; Kim et al., 2005; Cambaza, 2018), sind zytotoxisch und besitzen phytotoxische Wirkung auf Weizen (Song et al., 2004; Weber et al., 2018). Somit könnte beispielsweise eine frühzeitig ausgelöste Abwehrreaktion der Pflanze einer erfolgreichen Infektion durch die $\Delta Gpmk1$ entgegenwirken.

Eine weitere Gruppe von differentiell im Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ regulierten Transportern sind Aminosäure-Permeasen. Diese stellen unter anderem Aminosäuren für die Synthese von Sekundärmetaboliten bereit, können aber durch eine Sensor-Funktion von Stickstoff auch regulatorische Eigenschaften besitzen (Teichert et al., 2008; Pfannmüller et al., 2015). Die Aminosäure-Permease FfGap1 aus *F. fujikuroi* ist ein genereller Transporter für Aminosäuren, der bei einer Ausschaltung keinen Pathogenitäts-bezogenen Phänotyp auslöst. Die Permease wird in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Stickstoff in der Zelle verlagert. Bei geringer Verfügbarkeit ist FfGap1 an der Plasmamembran und bei einer hohen Konzentration von Aminosäuren befindet sie sich bei den Vakuolen (Pfannmüller et al., 2015). Ihre Expression ist strikt an den Transkriptionsfaktor AreA gekoppelt und wird sowohl im Myzel als auch während der Infektion einer Pflanze auf ähnlichem Niveau transkribiert (Lunprom et al., 2015; Pfannmüller et al., 2015). Im Wildtyp 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ ist die AreA (FGSG_08634) allerdings nicht differentiell reguliert und wird im Myzel, den Laufhyphen und den Infektionskissen auf einem ähnlichen Niveau transkribiert. Die Unterschiede in der Expression von Aminosäure-Transportern sind demnach nicht direkt durch die AreA induziert.

4.2.4 Transkriptionsfaktoren

Die funktionelle Gruppe der 892 Transkriptionsfaktoren in *F. graminearum* wird während der Infektion von Weizen nur in geringem Maß speziell reguliert. Im Wildtyp 8/1 werden 5 % der TF sowohl auf der Pflanze induziert als auch reprimiert werden. In der $\Delta Gpmk1$ werden hingegen nur 3 % der TF während des Infektionsprozesses verstärkt und 7 % vermindert transkribiert. Das Expressionsmuster zeigt, dass die TF codierenden Gene generell tendenziell stärker in der $\Delta Gpmk1$ transkribiert werden als im Wildtyp 8/1. Insgesamt sind auf der Pflanze 34 TF (4 %) in der $\Delta Gpmk1$ gegenüber dem Wildtyp 8/1 hochreguliert. Davon sind die meisten Gene (24 Gene) in den Laufhyphen verstärkt exprimiert. Im Wildtyp 8/1 sind dort nur 14 Gene stärker transkribiert als in der $\Delta Gpmk1$. In den Infektionskissen ist die Anzahl der hochregulierten Gene bei beiden Stämmen gleich.

Von den sowohl in den Laufhyphen als auch in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der $\Delta Gpmk1$ am stärksten transkribierten Genen werden zu einem Großteil TF mit einer Zink-Finger-Domäne codiert.

Viele davon sind wiederum von dem für Pilze spezifischen Typ der Zn₂/Cys₆-Domäne. Diese stellen in *F. graminearum* auch die Gruppe mit den meisten Vertretern (Son et al., 2011). Die Deletion dieser TF führte in *N. crassa* in 41 % der Fälle zu einer Veränderung des Hyphenwachstums oder der asexuellen bzw. sexuellen Reproduktion (Colot et al., 2006). In dem *F. graminearum* Stamm GZ3639 löste die Ausschaltung der Zn₂/Cys₆-TF hingegen nur bei 16 % der Mutanten einen Phänotyp aus. In der Gruppen Cys₂His₂-Zink-Finger-Proteine konnte auch in *F. graminearum* bei 41 % der Deletionsmutanten ein Phänotyp identifiziert werden (Son et al., 2011).

Ein Transkriptionsfaktor der Zn₂/Cys₆-Klasse in *F. graminearum* ist der Regulator GIP2 (FGSG_02320) des Sekundärmetabolit-Clusters der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Biosynthese (C13). Dieser ist in der Δ Gpmk1 während der Pflanzeninfektion tendenziell höher exprimiert als im Wildtyp 8/1. In einer Studie konnte beobachtet werden, dass GIP2 bei einer hohen Expression die Aurofusarin-Produktion verstärkt, allerdings auch zu einem verminderten Myzelwachstum führt (Kim et al., 2006). Dies könnte auch in der Δ Gpmk1 einer der Gründe für das verlangsamte Wachstum sein.

Ein weiterer bedeutender TF mit einer Zink-Finger-Domäne ist das Proteine TRI6 aus dem Sekundärmetabolit-Cluster der Trichothecen-Biosynthese (C23). Dieser ist in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 gegenüber denen der Δ Gpmk1 hochreguliert. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von neun Clustergenen sowie, abhängig von den äußeren Bedingungen, bei insgesamt mindestens 305 weiteren Genen (Seong et al., 2009; Nasmith et al., 2011). Das Protein TRI6 wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund dieser Eigenschaften, also der deutlichen Induktion der Genexpression während des Infektionsprozesses im Wildtyp 8/1 und der starken negativen Regulation in der Δ Gpmk1, in ebenjener durch Mutation überexprimiert. Der Effekt dieser Überexpression wird in einem späteren Kapitel behandelt (4.3.1).

In den Laufhyphen des Wildtyp 8/1 wird ein TF aus der Gruppe der Myb-Proteinfamilie stark hochreguliert. Dabei handelt es sich um den Regulator MYT2 (FGSG_07546). Von der Familie der Myb-TF sind in *F. graminearum* 19 Proteine codiert. Die Ausschaltung dieser führt bei 41 % zu einem Phänotyp. Auch von MYT2 ist bekannt, dass er in *F. graminearum* viele verschiedene Bereiche beeinflusst. In seiner Funktion als negativer Regulator des Zellwachstums, fördert seine Ausschaltung die Wachstumsrate des Pilzes, führt allerdings auch zu Defekten in der Bildung von Perithezien, den Ascosporen und von Konidien (Son et al., 2011). Alle drei waren deutlich vergrößert, jedoch trotzdem voll funktionsfähig. Die Überexpression des MYT2 bedingt hingegen ein deutlich reduziertes Wachstum sowie kleinere Perithezien und Sporen. Zudem ist die Produktion von Konidien um 96 % verringert. Eine signifikant schwächere Expression der Sekundärmetabolit-Cluster-Gene TRI5 und TRI6 bedingt unter anderem die stark reduzierte Synthese des Mykotoxins DON.

Sowohl die Deletion als auch die Überexpression des MYT2 führt zu einer deutlich weniger ausgeprägten Virulenz. Die Mutanten waren nur in der Lage die zum Inokulationspunkt benachbarten Ährchen einer Ähre des Weizenkultivars 'Eunpamil' zu infizieren (Son et al., 2011; Lin et al., 2012). Die geringere Expression dieses Gens in der Δ Gpmk1 könnte einer der Faktoren sein, welche die erhöhte Produktion von Konidien in diesem Stamm bedingt.

Auch die nah verwandten TF MYT1 (FGSG_00318) und MYT3 (FGSG_00324) spielen insbesondere im Wachstum, der Reproduktion und der Mykotoxin-Produktion eine wichtige Rolle in *F. graminearum* (Lin et al., 2011; Kim et al., 2014). Die Ausschaltung des MYT3 führt außerdem zu einem Arretieren der Infektion im Rachisboden der inokulierten Ährchen (Kim et al., 2014). Das codierende Gen des Proteins MYT1 ist im Wildtyp 8/1 auf der Pflanze induziert und in Laufhyphen und Infektionskissen in gleichem Maße transkribiert. In der Δ Gpmk1 ist die Transkription hingegen im Myzel am stärksten. Der TF MYT3 wird in beiden Stämmen nicht differentiell reguliert.

Das Protein AreA in *F. graminearum* (FGSG_08634) ist ein TF aus der Pilz-spezifischen GATA-Familie. Es stellt einen der generellen Stickstoff-Regulatoren in verschiedenen filamentösen Pilzen, wie *A. nidulans*, *N. crassa*, *F. fujikuroi* und *F. graminearum* dar (Fu & Marzluf, 1990; Kudla et al., 1990; Mihlan et al., 2003; Min et al., 2012). In *F. graminearum* ist AreA bedeutend für das generelle Wachstum und die Nutzung verschiedener Stickstoff-Quellen. Die Deletionsmutante der AreA ist beispielsweise nicht mehr in der Lage Nitrat und teilweise auch Urea als Substrat zu verwenden. Dies ist vermutlich die Folge einer Störung des Nitratreduktions-Prozesses (Min et al., 2012; Giese et al., 2013). Die Anwesenheit von Ammonium reprimiert die Expression von AreA hingegen (Hou et al., 2015). Auch die Bereitstellung der sieben Aminosäuren Aspartat, Histidin, Threonin, Tryosin, Isoleucin, Leucin und Valin ist abhängig von AreA. Dies ist insbesondere bei der Synthese von Sekundärmetaboliten von entscheidender Bedeutung (Giese et al., 2013).

Auch für die erfolgreiche Infektion von Weizen ist der Faktor AreA unerlässlich. Dies liegt insbesondere an der direkten Steuerung der DON-Biosynthese durch die Regulation der Cluster-Gene TRI6 und TRI10. Zwischen dem AreA und TRI10 findet eine direkte Protein-Protein-Interaktion statt. Dies zeigt insbesondere die Rolle des AreA als posttranslatonaler Protein-Modifikator (Min et al., 2012; Hou et al., 2015). Sowohl TRI6 als auch TRI10 sind in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 im Vergleich zum Wildtyp 8/1 stark herunterreguliert, was unter anderem durch eine Störung der Interaktion mit AreA ausgelöst werden könnte.

Ein weiterer Interaktionspartner von AreA ist der TF der Gal4-Familie NirA. Gemeinsam induzieren sie die Transkription verschiedener Gene, die Nitrat- oder Nitrit-Reduktasen sowie Nitrat-Permeasen codieren (Rand & Arst, 1978; Tollervey & Arst, 1981; Feng & Marzluf, 1998; Michielse et al., 2014). In den Infektionskissen der Δ Gpmk1 ist ein Gen mit Ähnlichkeit zu NirA (FGSG_05926) verstärkt exprimiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass durch die Mutation der Stickstoff-Metabolismus der Δ Gpmk1 Unterschiede zum Wildtyp 8/1 aufweist.

Neben den bisher genannten Proteinen sind die Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS) bedeutende TF. Sie fungieren als inaktivierender Faktor von GPCRs und regulieren somit eine Vielfalt von Prozessen (Lee & Adams, 1994; Yu et al., 1996; Son et al., 2011; Park et al., 2012; Son et al., 2013). Insbesondere die beiden TF mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597) spielen in *F. graminearum* eine entscheidende Rolle im Wachstum, der Reproduktion und Virulenz (Son et al., 2011; Park et al., 2012). Die codierenden Gene dieser beiden Proteine sind in der Δ Gpmk1 gegenüber dem Wildtyp 8/1 deutlich hochreguliert. Der Regulator FgFlbA ist hierbei in den Infektionskissen und FgFlbB in den Laufhyphen der Δ Gpmk1 verstärkt exprimiert. Zur weiteren Untersuchung der Eigenschaften dieser Proteine wurden sie in dieser Arbeit im Wildtyp 8/1 überexprimiert. Dies wird jedoch in einem späteren Kapitel genauer beschrieben (4.3.4).

4.2.5 Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies

Die Expression der 1073 Gene, die Proteine mit einer Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies (RRE) codieren, wird zu einem erheblichen Teil auf der Pflanze und im Myzel unterschiedlich reguliert. Insgesamt werden sowohl im Wildtyp 8/1 als auch der Δ Gpmk1 30 % der Gene während des Infektionsprozesses induziert oder reprimiert. Davon werden etwa zwei Drittel in beiden Stämmen induziert und ein Drittel auf der Pflanze reprimiert. Die generelle Expression der RRE nimmt unabhängig des Stamms vom Myzel über die Laufhyphen zu den Infektionskissen zu. Insbesondere im Myzel wird eine Gruppe der RRE stark herunterreguliert. Von den während der Weizeninfektion transkribierten RRE werden insgesamt 234 Gene (22 % der RRE) differentiell zwischen dem Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 reguliert. Dabei werden im Wildtyp 8/1 114 Gene und in der Δ Gpmk1 120 Gene verstärkt exprimiert. Diese werden etwa zu gleichen Teilen in den Laufhyphen und Infektionskissen des jeweiligen Stamms hochreguliert.

Von den in den Infektionskissen am stärksten hochregulierten Genen werden in beiden Stämmen vermehrt RRE aus der Familie der Monooxygenasen (MO) codiert. Diese Proteine katalysieren die Übertragung eines Sauerstoffatoms auf ein entsprechendes Substrat. Da für diesen Prozess ein Elektronendonator benötigt wird, verwenden Coenzym-unabhängige MO verschiedene Cofaktoren. Zwei grundsätzliche Varianten dieser Enzyme sind die Cytochrom P450 MO und die Flavin-abhängige MO. Diese üben in verschiedenen Bereichen filamentöser Pilze eine Funktion aus. Sie katalysieren unter anderem die Oxidationsreaktionen in der Synthese diverser Sekundärmetabolite. Zu diesen gehören Substanzen, wie Culmorin, sowie Pigmente, wie Aurofusarin, und Mykotoxine, wie DON. In *F. graminearum* ist die Cytochrom P450 MO Clm2 (FGSG_17598) in der Synthese des Sekundärmetabolits Culmorin entscheidend involviert.

Eine Deletion der Clm2 führt in *F. graminearum* zu einer erhöhten Virulenz, die sich sogar in einer Hypervirulenz auf dem teilresistenten Weizenkultivar 'Sumai 3' äußert (Gardiner et al., 2009). Allerdings wurde ebenfalls eine Reduktion der Virulenz durch die Ausschaltung beobachtet. Diese ist kritisch zu betrachten, da bei diesem Versuch experimentelle und statistische Unklarheiten vorliegen. Beispielsweise führte die ektopische Integration des Deletionskonstrukts in dieser Studie ebenfalls zu einer verminderten Pathogenität (Bahadoor et al., 2016). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression des Clm2 durch den Regulator des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecen-Biosynthese TRI6 reguliert wird. Eine Ausschaltung des TRI6 verringerte die Transkription des Clm2 (Gardiner et al., 2009). Die MO Clm2 hingegen reprimiert die Expression der Trichodien-Synthase TRI5, dem Schlüsselenzym der DON-Synthese. Die Ausschaltung der Clm2 führt zu einer verstärkten Expression der TRI5 und somit der gesamten DON-Produktion von *F. graminearum* während der Weizeninfektion. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei dieser MO zusätzlich um einen negativen Regulator des DON-Clusters handelt (Gardiner et al., 2009). Die Expression der MO wurde in einer Studie als Pflanzen-induziert charakterisiert (Güldener et al., 2006). Auch durch die Analyse der Transkriptom-Daten in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Clm2 zu den stark in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 transkribierten Genen zählt und zudem ebenfalls auf der Pflanze induziert wird. In der Δ Gpmk1 wird die Clm2 hingegen nicht bedeutend transkribiert. Dies könnte durch die ebenfalls sehr geringe Genexpression des TRI6 in der Δ Gpmk1 bedingt sein.

Auch in der Synthese des Pigments Aurofusarin ist eine Flavin-abhängige MO von entscheidender Bedeutung. Diese MO, AurF (FGSG_02327), katalysiert in einem Enzym-Komplex mit den drei Genen Gip1, AurO und AurS aus dem Sekundärmetabolit-Cluster der Aurofusarin- und Rubrofusarin-Synthese die Bildung von Aurofusarin aus Rubrofusarin (Frandsen et al., 2006, 2011). Eine Deletion der AurF führt zu einer unterbrochenen Produktion von Aurofusarin und somit zu einer Anreicherung des Rubrofusarin. Diese ist durch eine deutliche Gelbfärbung des Myzels der Mutante zu erkennen. Reguliert wird AurF durch einen der beiden Regulatoren des Clusters AurR1 (Frandsen et al., 2006). Die Synthese von Aurofusarin und damit die Expression der Clustergene sind eng an das vegetative Wachstum gekoppelt und finden beispielsweise nicht in den Perithezien von *F. graminearum* statt (Kim et al., 2006). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription des Sekundärmetabolit-Clusters im Wildtyp 8/1 eng mit dem Wachstum der Laufhyphen verbunden ist und in den komplexeren, spezialisierten Infektionskissen die Genexpression im Vergleich zu den Laufhyphen stark herunterreguliert wird. Im Gegensatz zum Wildtyp 8/1 wird der gesamte Cluster in der Δ Gpmk1 insbesondere im Myzel, aber auch in den Laufhyphen und Infektionskissen, durchgehend sehr stark transkribiert. Die tendenziell nicht durchgeführte Expression der Gene und somit vermutlich der Synthese von Aurofusarin wird in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 demnach weiter fortgesetzt.

Der Sekundärmetabolit-Cluster der Trichothecen-Biosynthese enthält insgesamt vier MO. Davon ist die Cytochrom P450 MO TRI4 (FGSG_03535) die mit der grundlegendsten Funktion, da sie die ersten vier Oxygenierungs-Reaktionen in der Trichothecen-Synthese übernimmt. Die anderen Cytochrom P45 MO, insbesondere TRI11 (FGSG_03540) und TRI13 (FGSG_03542), sind erst in mehreren späteren Reaktionen des Synthesewegs von Bedeutung (Hohn et al., 1995; McCormick et al., 2006; Villafana et al., 2019). Die Deletion der TRI4 führt daher zu einer Aggregation des ersten nicht-oxygenierten Zwischenprodukts Trichodien (Hohn et al., 1995). Die Transkription des codierenden Gens der TRI4 wird durch die Expression des Transkriptionsfaktors TRI6 aktivierend reguliert (Proctor et al., 1995). Alle drei genannten MO werden im Wildtyp 8/1 während der Pflanzeninfektion induziert und sind in den Infektionskissen gegenüber denen der Δ Gpmk1 hochreguliert. Dies lässt sich vermutlich unter anderem mit der fehlenden Expression des TRI6 in der Δ Gpmk1 erklären.

Eine weitere Funktion von MO ist die Detoxifikation für den Pilz schädlicher Substanzen (Covert et al., 1996; Pigné et al., 2017). Zu diesen gehören beispielsweise die von Pflanzen gebildeten Phytoalexine. Diese sind eine vielfältige Gruppe von Stoffen, die zur Verteidigung der Pflanze bei einem Angriff durch Schädlinge oder Pathogene ausgeschüttet werden (Ahuja et al., 2012). Die Synthese der Phytoalexine wird daher durch die Detektion von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) aktiviert (Bouizgarne et al., 2006; Qutob et al., 2006; Gust et al., 2007). Die Phytoalexine zeigen eine biologische Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen und sind deswegen ein entscheidender Teil des Resistenzsystems einer Pflanze (Ahuja et al., 2012). Zusätzlich haben einige Phytoalexine eine Wirkung als Radikalfänger und wirken somit als Antioxidantien verschiedener ROS. Sie agieren also als Gegenspieler zu den potentiell von einem Pathogen während der Infektion produzierten ROS (Smoliga et al., 2011). Dem zytotoxischen Effekt vieler Phytoalexine liegen beispielsweise phenolische Bestandteile oder das Flavonoid-Grundgerüst zu Grunde, da diese einen entscheidenden Anteil an deren Giftigkeit haben (Pedras et al., 2011; Ahuja et al., 2012). Daher ist die Modifikation dieser Stoffe durch das Pathogen von entscheidender Bedeutung. Hierfür wird unter anderem eine Demethylierung der Phytoalexine durch Cytochrom P450 MO durchgeführt (Covert et al., 1996; Smith, 1996; Ahuja et al., 2012).

Während der Infektion einer Wirtspflanze spielen MO zusätzlich eine Rolle beim Abbau und der Nutzung von pflanzlichen Substanzen. Beispielsweise sind die sekretierten lytischen Polysaccharid-MO (LPMO) ein essentieller Bestandteil des Infektionsprozesses, da sie die Depolymerisierung ihres jeweiligen Substrats durchführen und es so für weitere abbauende Enzyme zugänglich machen (Beeson et al., 2012; Isaksen et al., 2014). Bei den Substraten handelt es sich um Polysaccharide, wie Cellulose, Xyloglucan und andere 1,4- β -Glucane sowie Stärke und Xylan (Quinlan et al., 2011; Agger et al., 2014; Vu et al., 2014; Frommhagen et al., 2015). Daher sind die LPMO ebenfalls ein Bestandteil der funktionellen Kategorie der kohlenhydrataktiven Enzyme (CAZy).

Die Oxygenierungsreaktion der Polysaccharide ist dabei anhängig von einem reduzierten Kupfer-Ion im aktiven Zentrum der LPMO (Kjaergaard et al., 2014). Im Genom von *F. graminearum* codieren 18 Gene LPMO (King et al., 2015). Im Wildtyp 8/1 wird die Transkription von elf Genen während des Infektionsprozesses induziert. Zudem gehören die LPMO zu den in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 am stärksten differentiell regulierten Genen. Im Wildtyp 8/1 sind dort gegenüber der Δ Gpmk1 neun LPMO stärker exprimiert, nur eine (FGSG_08011) wird in der Δ Gpmk1 höher reguliert. Die übrigen acht Gene werden in beiden Stämmen auf dem gleichen Niveau transkribiert, allerdings werden vier dieser Gene nahezu gar nicht und drei nur in einem geringen Maß exprimiert. Nur das Gen eines Proteins (FGSG_03695) besitzt in beiden Stämmen eine starke Transkription. Aufgrund der grundlegenden Funktion der LPMO im Abbauprozess des pflanzlichen Materials könnte diese Deregulation in der Δ Gpmk1 einen großen Einfluss auf den Infektionsverlauf zeigen.

Neben den LPMO verwenden weitere Metalloproteine mit einer Verbindung zu ROS Kupfer-Atome für ihre Reaktion. Zu diesen zählen Cupredoxine, welche nur ein einzelnes Kupfer-Atom im aktiven Zentrum enthalten (Solomon et al., 2004), Laccasen und Superoxid-Dismutasen (SOD). Laccasen besitzen vier Kupfer-Atome im aktiven Zentrum (Solomon et al., 1996; Zhu & Williamson, 2004) und sind Proteine mit einer stark konservierten Sequenz (Messerschmidt & Huber, 1990). Eine der vier Klassen von SOD verwendet einen Cofaktor aus Kupfer und Zink. Die übrigen drei SOD-Klassen nutzen Mangan-, Eisen- oder Nickel-Atome (Fridovich, 1995; Yao et al., 2016).

Cupredoxine erfüllen die einfache Funktion eines Transporters von Elektronen zwischen zwei Proteinen (Choi & Davidson, 2011). Im Wildtyp 8/1 wird die Transkription von zwei Cupredoxinen (FGSG_04390 und FGSG_06023) während der Infektion der Wirtspflanze in den Infektionskissen stark induziert. Im Gegensatz dazu findet in der Δ Gpmk1 keine nennenswerte Expression dieser Gene auf der Pflanze statt.

In phytopathogenen Pilzen haben Laccasen drei wichtige Hauptfunktionen. Sie können Teil der Synthese von Sekundärmetaboliten oder dem Abbau von Lignin sein und haben eine detoxifizierende Funktion gegenüber phenolischen Verbindungen, beispielsweise aus Phytoalexinen oder bei Freisetzung im Rahmen der Zersetzung des Lignins (Solomon et al., 1996; Leonowicz et al., 2001; Schouten et al., 2002; Hernández-Monjaraz et al., 2018). Aufgrund dieser vielseitigen Einsatzbereiche ist die Substratspezifität der Laccasen relativ gering (Solomon et al., 1996). Die Expression von Laccasen wird zu einem großen Teil durch äußere Faktoren induziert. Die Transkription kann durch verschiedene Metall-Ionen (Kupfer, Mangan oder Silber), aromatische Verbindungen sowie ein bestimmtes Verhältnis der Verfügbarkeit von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen aktiviert werden. Eine hohe Verfügbarkeit von Kohlenstoff induziert die Expression von Laccasen.

Bezüglich der Stickstoffquelle ist die Aktivität der Laccasen abhängig von der Art und Menge des verfügbaren Stickstoffs. Generell gilt allerdings, dass eine anorganische Stickstoffquelle zu einer geringen Aktivität und organische Quellen hingegen zu einer erhöhten Expression von Laccasen führen (Piscitelli et al., 2011). In der $\Delta Gpmk1$ werden drei Laccasen codierende Gene (FGSG_02328, FGSG_13185 und FGSG_15695) in den Infektionskissen stärker transkribiert als in denen des Wildtyps 8/1. Eine dieser Laccasen (FGSG_13185) wird zudem auch in den Laufhyphen der $\Delta Gpmk1$ verstärkt reguliert. Da die Expression von Laccasen unter anderem durch die Präsenz von Phytoalexinen induziert wird (Schouten et al., 2002), lässt die erhöhte Transkription dieser Gene auf eine Abwehrreaktion durch die Weizenpflanze schließen. Da die Aktivierung der Laccasen im Wildtyp 8/1 nicht in diesem Maß stattfindet, könnte dies eine abweichende und potentiell stärkere Reaktion der Wirtspflanze auf eine angehende Infektion durch die $\Delta Gpmk1$ aufzeigen.

Eine weitere wichtige Familie der RRE sind die Superoxid-Dismutasen (SOD). Zusammen mit Peroxidasen dienen sie der Detoxifikation von ROS, wie Wasserstoffperoxid oder molekularem Sauerstoff. Die SOD stehen in der Reaktionskette dabei vor den Peroxidasen (Fridovich, 1995; Yao et al., 2016). Eine Untersuchung der vier SOD in *A. fumigatus* zeigte, dass die SOD für den Abbau von ROS im Myzel des Pilzes verantwortlich sind. Sie agieren dabei unabhängig voneinander, sind aber Teil des gemeinsamen Prozesses der Detoxifikation. Daher führt eine Ausschaltung multipler SOD zu schwereren negativen Phänotypen als bei einer Einzel-Deletion der SOD (Lambou et al., 2010). Die AfSOD4 erwies sich bei ihrer Charakterisierung als essentiell für *A. fumigatus*. Eine Deletion der übrigen SOD führte zu einer gesteigerten Sensibilität gegenüber intrazellulärem oxidativem Stress. Die Expression der SOD wurde hingegen nicht ausschließlich durch oxidativen Stress, sondern als generelle Reaktion auf Stress induziert (Lambou et al., 2010).

Im Genom von *F. graminearum* werden fünf SOD codiert. Insbesondere die SOD1 spielt dabei in verschiedenen Bereichen eine entscheidende Rolle. Ihre Deletion führt zu einem leicht verringerten generellen Wachstum sowie einer erhöhten Sensibilität gegenüber intrazellulär ausgelöstem Stress durch ROS (Yao et al., 2016). Bedeutender hingegen ist, dass eine Ausschaltung die Virulenz auf Weizen stark reduziert. Die Mutante kann ausschließlich mit wenigen Hyphen die Lemma und Palea des inokulierten Ährchens infizieren. Zudem hat die fehlende Expression der SOD1 eine stark verringernde Wirkung auf die Biosynthese des Mykotoxins DON (Yao et al., 2016). Die Transkription der codierenden Gene der SOD1, SOD2 und SOD3 (FGSG_08721, FGSG_04454 und FGSG_02051) wurde durch die Infektion von Weizen induziert (Yao et al., 2016). Auch die Transkriptom-Daten dieser Arbeit zeigten eine verstärkte Transkription dieser Gene auf der Pflanze. Speziell die SOD1 ist im Wildtyp 8/1 Pflanzen-induziert und tendenziell in Infektionskissen des Wildtyps 8/1 gegenüber der $\Delta Gpmk1$ hochreguliert.

Dennoch wird die SOD1 auch in der Δ Gpmk1 in gewissem Maß transkribiert. Die SOD4 und SOD5 (FGSG_00576 und FGSG_07069) werden generell eher schwach transkribiert. Während der Weizeninfektion wird die SOD5 in der Δ Gpmk1 induziert und tendenziell in den Infektionskissen der Mutante hochreguliert. Bei der SOD5 handelt es sich um eine sekretierte SOD, welche mit potentiellen ROS im extrazellulären Raum reagiert. Die erhöhte Transkription des codierenden Gens der SOD5 in der Δ Gpmk1 ist ein weiteres Indiz für den erhöhten Stress, dem die Mutante gegenüber dem Wildtyp 8/1 während des Infektionsprozesses ausgesetzt ist.

4.2.6 Effektorproteine und Lipasen

Die Merkmale zur Einteilung von putativen Effektorproteinen (PE) sind im Allgemeinen nicht fest definiert. Grundsätzlich werden PE allerdings als sekretierte Proteine ohne eine bekannte oder mit bereits identifizierter Effektor-bezogener Proteindomäne beschrieben. Eigenschaften wie die Größe oder der Anteil an Cystein in der Aminosäuresequenz sind mögliche Eingrenzungsvarianten (Doehlemann et al., 2009; Morais do Amaral et al., 2012; Sperschneider et al., 2013; Lu & Edwards, 2016). In dieser Arbeit wurden PE, neben ihren enthaltenen Domänen und ihres Sekretionspotentials, anhand der Größe, die 1000 Aminosäuren nicht übersteigt, und der nicht vorhandenen Zugehörigkeit zu einem Sekundärmetabolit-Cluster eingeteilt. Ein hoher Cystein-Gehalt der PE wurde nicht zum Ausschluss angewendet, da insbesondere Effektoren nekrotropher Pilze eher wenige Cysteine in der Sequenz besitzen (Tan et al., 2010).

Insgesamt konnten so 524 Gene identifiziert werden, die potentiell Effektorproteine codieren. Die Transkription von 23 % dieser Gene (121 Gene) war im Wildtyp 8/1 und von 24 % (126 Gene) in der Δ Gpmk1 während der Pflanzeninfektion induziert. Reprimiert wurden auf der Pflanze nur 9 % (48 Gene) im Wildtyp 8/1 und 11 % (57 Gene) in der Δ Gpmk1. Das generelle Transkriptionsmuster der PE ist in allen Zelltypen der beiden Stämme eher ausgewogen, zeigt allerdings zwei Gruppen mit einer starken differentiellen Regulation in den Infektionskissen der beiden Stämme. Somit werden auf der Pflanze 36 % aller PE (188 Gene) differentiell in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1 reguliert. Davon sind jeweils etwa 9 % (durchschnittlich 47 Gene) in den Laufhyphen bzw. Infektionskissen der beiden Stämme verstärkt transkribiert.

Die übergeordnete Funktion der Effektorproteine phytopathogener Pilze ist es, eine Wirkung auf Prozesse der Wirtspflanze auszuüben, die einen positiven Effekt auf den Infektionsverlauf hat. Dies kann beispielsweise anhand der Unterdrückung einer (unmittelbaren), durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) ausgelösten Verteidigungsreaktion der Pflanze erreicht werden. Insbesondere biotroph lebende Phytopathogene sind darauf angewiesen ihre Anwesenheit gegenüber der Pflanze so zu verschleiern. (Kämper et al., 2006; Shimada et al., 2006; Kleemann et al., 2012).

In *Ustilago maydis* wird das Effektorprotein Pit2 zur Unterdrückung der pflanzlichen Abwehrreaktion eingesetzt. Pit2 inhibiert die enzymatische Aktivität von Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen durch die Blockierung des aktiven Zentrums. Dieser Mechanismus ist eng auf die Beziehung des Pilzes und der Wirtspflanze abgestimmt, sodass selbst ein Protein-Ortholog aus *U. hordei* diese Funktion in *U. maydis* nicht übernehmen kann (Misas Villamil et al., 2019).

Der Effektor Cmu1, ebenfalls aus *U. maydis*, ist eine Chorismat-Mutase und somit Teil des initialen Biosynthesewegs für Tyrosin- und Phenylalanin. Das Protein wird während einer Infektion der Wirtspflanze sekretiert und von der Pflanze aufgenommen. Die folgende Ausbreitung des Effektors im pflanzlichen Gewebe führt zu einer Modifikation des metabolischen Zustands der Zellen. So wird die Produktion von Salicylsäure, einer antimikrobiell wirkenden Substanz, unterbunden und kann nicht gegen das Pathogen eingesetzt werden (Djamei et al., 2011). Eine Unterbrechung dieser beiden Mechanismen von Pit2 und Cmu1 führt zu einer teils stark verminderten Virulenz von *U. maydis* (Djamei et al., 2011; Misas Villamil et al., 2019).

Auch wenn dies hoch-spezialisierte Wirkungsweisen von Effektorproteinen eines biotrophen Phytopathogens sind, lassen sich ähnliche Prinzipien in einem nekrotrophen Pilz nicht ausschließen. Die Δ Gpmk1 kann den erfolgreichen Infektionsprozess bereits auf der Pflanzenoberfläche nicht fortsetzen. Die Infektionskissen auf Weizenpaleae können keine Penetration der Pflanzenzellen einleiten und auf Glumae von Weizen werden keine Infektionskissen gebildet. Da die Δ Gpmk1 offensichtlich fähig ist Infektionskissen zu formen, muss auf Glumae die Interaktion zwischen Wirtspflanze und *F. graminearum* in gewisser Weise gestört sein. Ein möglicher Ansatz sind in der Δ Gpmk1 fehlende PE mit einer Abwehrreaktions-inhibierenden Funktion wie bei *U. maydis*. Allerdings sind in *F. graminearum* keine direkten Orthologe der beiden Proteine, Pit2 und Cmu1, bekannt. Aufgrund der hohen Anzahl der differentiell im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 regulierten PE (188 Gene) könnten bisher unbekannte Proteine dieser Wirkungsart in *F. graminearum* vorhanden sein und die Avirulenz der Δ Gpmk1 bedingen.

Im Gegensatz dazu haben nekrotrophe Pilze Maßnahmen entwickelt die Pflanze mittels Effektorproteinen aktiv zu schädigen. In *Pyrenophora tritici* wurden kleine Effektorproteine identifiziert, welche an Rezeptoren der Wirtspflanze binden und so eine Abwehrreaktion, wie die hypersensitive Reaktion (HR), auslösen. Diese sogenannten TOX-Proteine induzieren so den programmierten Zelltod (PCD), welcher zu Nekrosen führt (Tan et al., 2010). Der exakte Wirkungsmechanismus dieser Ausnutzung der pflanzlichen Abwehrreaktion ist bisher unbekannt. Diese Form der Interaktion ist allerdings hochgradig auf die Beziehung zwischen Wirt und Pathogen abgestimmt (Hammond-Kosack & Rudd, 2008; Tan et al., 2010).

F. oxysporum setzt kleine SIX-Proteine ein, die in das Xylem der Wirtspflanze sekretiert werden, um die Infektion weiter voran zu treiben. Auch diese lösen in der Pflanze die Reaktion von Resistenz-Genen aus und nutzen so das Abwehrsystem gezielt für einen Vorteil des Pathogens (Rep et al., 2004; Lievens et al., 2009). Die SIX-Proteine codierenden Gene sind dabei sehr divers und können zur Unterscheidung verschiedener Isolate eines Phytopathogens eingesetzt werden (Lievens et al., 2009).

Eine weitere Form der Effektorproteine enthält eine LysM-Domäne. Diese besitzen das Potential an Polysacchariden zu binden und zeigen dabei eine Spezifität gegenüber Chitin (de Jonge et al., 2010). Der Effektor Slp1 auf *M. oryzae* ist ein Protein dieser Familie. Es wird in den Raum zwischen Pilz und Wirtspflanze sekretiert und bindet dort an das Chitin in der Zellwand invasiver Pilzhyphen. So wird die Wahrnehmung des Chitins durch die Pflanze gestört und das Chitin wird nicht als PAMP erkannt (Mentlak et al., 2012). In *Colletotrichum higginsianum* werden LysM-Effektoren während der frühen biotrophen Infektionsphase aktiviert und besitzen neben dem Verschleierungseffekt eine Funktion in den Appressorien des Pilzes. Deletionsmutanten des Effektors ChELP1 waren nicht mehr in der Lage eine erfolgreiche Penetration der Pflanzenoberfläche durchzuführen (Takahara et al., 2016). Auch in *F. graminearum* sind zwölf Proteine mit einer LysM-Domäne vorhanden. Von diesen sind drei codierende Gene (FGSG_02255, FGSG_07569 und FGSG_10563) sowohl im Wildtyp 8/1 als auch der Δ Gpmk1 auf der Pflanze induziert. Das Gen FGSG_10561 wird hingegen nur im Wildtyp 8/1 pflanzen-induziert und ist zudem in den Laufhyphen tendenziell und in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 stark herunterreguliert. Das Gen FGSG_10563 ist ebenfalls in beiden Zelltypen in der Δ Gpmk1 stark herunterreguliert. Im Kontrast dazu ist ein Gen (FGSG_02255) in den Laufhyphen und ein Gen (FGSG_07569) in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 deutlich hochreguliert. Diese veränderte Regulation könnte ein weiterer Auslöser für die verminderte Virulenz der Δ Gpmk1 sein.

Eine weitere Proteinfamilie, die teilweise als Effektor klassifiziert wird, sind sekretierte Lipasen (Blümke et al., 2014). Die Lipasen Fgl1 (FGSG_05906) und LIP1 (FGSG_01603) sind dabei die am besten beschriebenen Proteine dieses Typs in *F. graminearum* (Feng et al., 2005; Voigt et al., 2005; Salomon et al., 2012; Blümke et al., 2014; Brown et al., 2017). Beide Lipasen werden während des Infektionsprozesses auf Weizen exprimiert und zeigen eine extrazelluläre lipolytische Aktivität. Diese kann von entscheidender Bedeutung für den Infektionsverlauf eines Phytopathogens sein (Comménil et al., 1998; Voigt et al., 2005).

Die Transkription der Fgl1 kann durch die Anwesenheit pflanzlicher Zellwand-Komponenten induziert werden (Phalip et al., 2005). Dies ist bei der LIP1 nicht der Fall. Dafür kann die Expression der LIP1 selbst die Regulation weiterer Lipasen bedingen (Feng et al., 2005).

Im Gegensatz zur LIP1 besitzt die Fgl1 Einfluss auf die Virulenz von *F. graminearum*. Die Ausschaltung der Fgl1 führt dazu, dass der Pilz den Blütenboden nicht mehr überwinden und somit nicht in die Rachis vordringen kann (Voigt et al., 2005).

Eine Überexpression der Fgl1 führt in der Δ Gpmk1 zu einer partiell wiederhergestellten Virulenz. Diese Mutante ist in der Lage die inokulierte Weizenblüte bis zur Rachis vollständig zu infizieren (Salomon et al., 2012). Dennoch wird die Fgl1 sowohl im Wildtyp 8/1 als auch der Δ Gpmk1 in den Laufhyphen und den Infektionskissen in gleichem Maß transkribiert. Die Genexpression ist ausschließlich im Myzel des Wildtyps 8/1 um ein Wesentliches höher als im Myzel der Δ Gpmk1. Die LIP1 wird hingegen in den Laufhyphen und den Infektionskissen der Δ Gpmk1 hochreguliert. Ebenso werden die codierenden Gene von drei weiteren Lipasen (FGSG_03687, FGSG_04818 und FGSG_11386) ausschließlich in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 verstärkt transkribiert. Dass die Lipase-Aktivität von *F. graminearum* in einer engen Beziehung zu der Expression der Gpmk1 steht, konnte bereits in einer vorherigen Studie gezeigt werden (Jenczmionka & Schäfer, 2004). Die Δ Gpmk1 zeigt zwar eine verspätete extrazelluläre lipolytische Aktivität bei einer künstlichen Induktion mit Weizenkeimöl, jedoch eine signifikant gesteigerte Aktivität von Lipasen im Zytoplasma. Somit könnte der stagnierende Infektionsprozess eine potentielle Kompensationsreaktion der Δ Gpmk1 auslösen und daher nach einer gewissen Zeit zu einer gesteigerten Expression der vier genannten Lipasen führen.

4.2.7 Kohlenhydrataktive Enzyme

Aus der funktionellen Kategorie der kohlenhydrataktiven Enzyme (CAZy) werden in *F. graminearum* 513 Gene angenommen (Lombard et al., 2014). Von diesen werden insgesamt 225 nicht-sekretierte und 288 sekretierte Proteine codiert. Somit sind über die Hälfte der CAZy außerhalb der Pilzzellen aktiv. Auf der Pflanze werden im Wildtyp 8/1 32 % aller CAZy (164 Gene) und in der Δ Gpmk1 35 % der CAZy (179 Gene) induziert. In den Laufhyphen und den Infektionskissen der beiden Stämme werden zusammengekommen 190 Gene (37 %) differentiell reguliert. Unter diesen ist der Anteil der sekretierten CAZy um das Dreifache höher und liegt bei etwa 75 % (141 Gene). Dies spiegelt die entscheidende Rolle wieder, welche CAZy während des Infektionsprozesses und der Verwertung der Wirtspflanze einnehmen (Zhang et al., 2012). Durch die Sekretion der Proteine kann die benötigte direkte Interaktion zwischen den pflanzlichen Stoffen und den CAZy stattfinden. Das Verhältnis von nicht-sekretierten zu sekretierten Proteinen ist allerdings im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 sehr unterschiedlich. In der Δ Gpmk1 ist der Anteil hochregulierter sekretierter CAZy in den Laufhyphen und Infektionskissen nur halb so groß wie im Wildtyp 8/1.

In den Laufhyphen der Δ Gpmk1 ergibt sich daraus ein Unterschied in der Regulation von 22 Genen sekretierter Proteine, die im Vergleich zum Wildtyp 8/1 nicht verstärkt transkribiert werden. Auch in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 werden 11 Gene sekretierter CAZy weniger hochreguliert. Dafür ist dort der Anteil nicht-sekretierter Enzyme fast doppelt so hoch wie im Wildtyp 8/1.

Eine funktionelle Analyse der differentiell zwischen Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 regulierten Gene zeigte, dass Enzyme mit einer Aktivität gegenüber Cellulose, Hemicellulosen wie Xylan, sowie Glycosiden in beiden Stämmen in einem vergleichbaren Maß hochreguliert werden. Diese Substrate sind jeweils ein Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand (Reiter, 1998) und werden damit im Rahmen des Infektionsprozesses von *F. graminearum* abgebaut und verwertet. Auch bisherige Studien mit *C. higginsianum* und *F. graminearum* zeigten eine verstärkte Expression von Proteinen dieser Familien während der Infektion von Weizen (O'Connell et al., 2012; Zhang et al., 2012). Dennoch können Unterschiede in der Regulation dieser Proteine während der initialen Phase der Infektion nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer künstlichen Induktion der enzymatischen Aktivität sekretierte Endoglucanasen, Xylanasen und Proteasen eine verspätete Aktivität gegenüber dem Wildtyp 8/1 aufweisen. Dennoch wurde nach wenigen Tagen das Aktivitäts-Niveau des Wildtyps 8/1 erreicht (Jenczmionka & Schäfer, 2004).

Einen unterschiedlichen Anteil an den hochregulierten Genen nehmen im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 Proteine aus den Familien der Cutinasen, Pektinasen, Laccasen und lytischen Polysaccharid-Monooxygenasen (LPMO) ein.

Aus der Familie der Cutinasen sind in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 sechs codierende Gene hochreguliert. In der Δ Gpmk1 werden hingegen keine Cutinasen verstärkt transkribiert. Auch bei der Familie der Pektinasen ist die Regulation in den beiden Stämmen vergleichbar. In den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 ist die Transkription von insgesamt 7 Pektinasen codierenden Genen gesteigert. Von diesen zeigen zwei Gene (FGSG_02386 und FGSG_09291) eine besonders hohe Expression. Das Gen FGSG_09291 wurde auch während des Infektionsprozesses von *F. graminearum* auf Weizen-Coleoptilen als eines der am stärksten induzierten und hochregulierten Gene einer Pektinase identifiziert (Zhang et al., 2012). In der Δ Gpmk1 wird hingegen nur eine Pektinase (FGSG_11163) stärker als in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 transkribiert. Da die oberste Zellschicht der Pflanzenoberfläche unter anderem aus Cutin und Pektin besteht, ist für Phytopathogene die lytische Aktivität von Enzymen, wie Cutinasen und Pektinasen, von entscheidender Bedeutung für den Infektionsverlauf. In der Δ Gpmk1 werden sowohl in den Laufhyphen als auch in den Infektionskissen signifikant weniger dieser Proteine exprimiert. Dies könnte den Phänotyp der Δ Gpmk1 erklären, dass keine Penetration der Pflanzenoberfläche durchgeführt werden kann, sowie, dass sich die Infektion nicht in tiefere Zellebenen ausbreiten kann und bestenfalls subcuticulär verläuft. Ein weiterer Effekt der eine geringere Transkription Pektinase-codierender Gene bedingen kann, ist die mögliche Induktion von Phytoalexinen durch Pektin-Oligosaccharide, welche beim Abbau der Zellwand durch Pektinasen freigesetzt werden können (Hahn et al., 1981; Nothnagel et al., 1983; Voragen et al., 2009). Die Aktivität von Pektinasen kann direkt durch polyphenolische Phytoalexine, beispielsweise aus der Familie der Flavonoide, gehemmt werden (Hunter, 1974; Cho & Lee, 2015).

Zudem deutete die Regulation verschiedener Gene bereits mehrfach auf eine erhöhte Belastung der Δ Gpmk1 durch die pflanzliche Pathogenabwehr hin. Daher könnte auch die verminderte Transkription von Pektinase-codierenden Genen eine Reaktion der Δ Gpmk1 auf erhöhte Phytoalexin-Konzentrationen sein, um so deren Produktion durch die Pflanze und deren Effekt auf den Pilz zu minimieren.

Die Proteinfamilien der Laccasen und LPMO wurden bereits detailliert im Abschnitt über Proteine mit einer Verbindung zu ROS (RRE, 4.2.5) behandelt. Zusammengefasst sind diese Proteine sowohl aktiv gegenüber Kohlenhydraten als auch ROS. Laccasen haben unter anderem die Funktion mit phenolischen Verbindungen zu reagieren und diese so zu detoxifizieren. Ihre Genexpression ist in der Δ Gpmk1 insgesamt wesentlich höher als im Wildtyp 8/1. Die Gruppe der LPMO dient hingegen dem Abbau verschiedener Polysaccharide und die codierenden Gene dieser Proteine werden fast ausschließlich im Wildtyp 8/1 verstärkt transkribiert. Daher kann die unterschiedliche Regulation dieser beiden Familien in der Δ Gpmk1 und dem Wildtyp 8/1 Einfluss auf die Virulenz der Δ Gpmk1 besitzen.

4.3 Charakterisierung der erstellten Mutanten

Zur Identifizierung potentiell Virulenz-beeinflussender Proteine in *F. graminearum* wurde die Regulation der codierenden Gene in den Transkriptom-Daten des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 verglichen. Dabei wurden Gene aus verschiedenen funktionellen Gruppen mit einer differentiellen Expression ausgewählt. Diese wurden anschließend im Wildtyp 8/1 bzw. der Δ Gpmk1 ausgeschaltet oder überexprimiert. Die durch Transformation von *F. graminearum* erstellten Mutanten wurden auf verschiedene grundlegende Aspekte, wie Virulenz auf Weizen, Wachstum unter Stress, Oxidationszustand, asexuelle Reproduktion, sowie spezifische Protein-bezogene Faktoren untersucht.

4.3.1 Überexpression der Transkriptionsfaktoren TRI6 und TRI10 in der Δ Gpmk1

Sekundärmetabolite sind in vielen Pathogenen von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Infektion. Auch bei *F. graminearum* nehmen Substanzen wie beispielsweise Pigmente oder Mykotoxine eine entscheidende Rolle im Infektionsprozess ein. Im Genom von *F. graminearum* werden insgesamt 687 Proteine von Genen in Sekundärmetabolit-Clustern codiert. Der Cluster der Trichothecen-Biosynthese C23 besteht aus insgesamt 15 Genen, welche als TRI-Gene bezeichnet werden. In dem Cluster werden die zwei Transkriptionsfaktoren TRI6 (FGSG_16251) und TRI10 (FGSG_03538) codiert. Diese regulieren die Expression der meisten Cluster-Gene sowie mehrerer Gene ohne einen direkten Bezug zur Synthese von Trichothecenen (Proctor et al., 1995; Tag et al., 2001; Peplow et al., 2003; Seong et al., 2009; Nasmith et al., 2011).

Die Expression von TRI6 und TRI10 wird durch verschiedene Faktoren gesteuert. Die verfügbare Stickstoff-Quelle des Pilzes steuert über den Transkriptionsfaktor AreA die Aktivität des TRI-Clusters und dessen Regulatoren (Ilgen et al., 2009; Min et al., 2012; Giese et al., 2013; Hou et al., 2015). Auch haben der pH-Wert sowie das intrazelluläre Niveau von cAMP einen direkten Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren und katalytischen Enzyme des TRI-Clusters (Merhej et al., 2011; Hu et al., 2014; Jiang et al., 2016). Ein niedriger pH-Wert führt zu einer verstärkten Transkription der Cluster-Gene TRI4, TRI5, TRI6 und TRI10 sowie des, außerhalb des Cluster-Lokus liegenden, TRI101. Der genaue Mechanismus ist dabei bisher nicht bekannt, allerdings nimmt der Regulator des pH-Systems in *F. graminearum* FgPac1 (FGSG_12970) eine zentrale Position in diesem Prozess ein (Merhej et al., 2011). Ein erhöhtes Niveau an intrazellulärem cAMP führt zu einer verstärkten Aktivierung von cAMP-gekoppelten Protein-Kinasen und der daraus folgenden Freisetzung ihrer katalytischen Untereinheit. Diese führt durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors AreA sowie einer vermuteten Unterdrückung der eigen-inhibitorischen Funktion des TRI6 zu einer Induktion der Trichothecen-Biosynthese (Jiang et al., 2016). Die Transkription des TRI-Clusters unterscheidet sich im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 deutlich und legt damit eine gestörte Induktion der Mykotoxin-Produktion in der Mutante nahe. Der Regulator FgPac1 ist beispielsweise in den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 stärker transkribiert als in denen der Δ Gpmk1. Auch Interaktionspartner des AreA wie das Protein NirA sind in der Δ Gpmk1 differentiell reguliert und führen somit zu einer Veränderung des Stickstoff-Metabolismus der Mutante (4.2.4). Die Deletion der Gpmk1 könnte weiterhin zu einer Störung des cAMP-Gleichgewichts in den Zellen von *F. graminearum* führen und somit die Kontrolle verschiedener Prozesse stören (Bormann et al., 2014; Jiang et al., 2016). Im Wildtyp 8/1 wird die Transkription von 13 der 15 Gene des Clusters auf der Pflanze induziert. Von diesen sind alle in den Infektionskissen hochreguliert. In der Δ Gpmk1 sind hingegen nur sechs der Gene auf der Pflanze verstärkt transkribiert. Davon sind nur zwei Gene in den Infektionskissen und vier Gene in den Laufhyphen hochreguliert. Die Expression von TRI6 findet dabei nur in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 statt. Der Transkriptionsfaktor TRI10 wird hingegen in den Laufhyphen der Δ Gpmk1 am stärksten transkribiert, ist allerdings in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 stark reduziert und somit auch deutlich schwächer transkribiert als in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1. Insgesamt sind elf Gene des Clusters in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 gegenüber der Δ Gpmk1 hochreguliert. Darunter das Schlüsselenzym der Trichothecen-Biosynthese TRI5, eine Trichodien-Synthase (Maier et al., 2006), sowie die bereits genannten Regulatoren TRI6 und TRI10. Um den Effekt der Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren in der Δ Gpmk1 zu untersuchen, wurden Überexpressionsmutanten des TRI6 und des TRI10 erstellt und charakterisiert.

Zunächst wurde ein Transkriptionsprofil des TRI-Clusters während der Weizeninfektion durch den Wildtyp 8/1 erstellt. Im Vergleich zu einer axenischen Kultur werden zwölf Gene des Clusters im Infektionsprozess (7 dpi) stärker transkribiert. Darunter die meisten katalytisch wirkenden Enzyme des Synthesewegs der Trichothecene, die beiden Regulatoren TRI6 und TRI10 sowie das Schlüsselprotein TRI5. Auf der Pflanze und im Myzel in gleichem Maß transkribiert wurde nur TRI7, eine Acetyltransferase, die zusammen mit TRI13 den Toxin-Chemotyp des jeweiligen *Fusarium*-Stamms definiert (Lee et al., 2002). Das Cluster Gen FGSG_03529 und TRI13 sind in der Myzelkultur stärker transkribiert als während der Infektion von Weizen. Das Gen FGSG_03529 codiert eine 1,3- β -D-Glucan-Endohydrolase und TRI13 eine Cytochrom P450 MO. Die verminderte Transkription des TRI13 steht, wie die des TRI7, im Zusammenhang mit der Produktion von Deoxynivalenol (DON). Durch diese Regulation der beiden Proteine wird die Produktion von DON an Stelle von Nivalenol (NIV) gefördert. Sowohl die Proteinsequenz des TRI7 als auch die des TRI13 haben mehrere Mutationen unterlaufen, so dass die Proteine nicht-funktional in Stämmen mit einem DON-Chemotyp sind (Lee et al., 2001, 2002). Dies erklärt die geringe Induktion und Transkription dieser beiden Enzyme während der Infektion.

Die Überexpression der beiden Transkriptionsfaktoren TRI6 und TRI10 führt in der Δ Gpmk1 sowohl in einer Myzelkultur als auch während der Pflanzeninfektion zu einer umfassenden Neuregulation der Gene des TRI-Clusters. Im Myzel wird durch die künstlich verstärkte Expression des TRI6 die Transkription von drei Genen (TRI4, TRI5 und TRI8) nur gegenüber der Δ Gpmk1 erhöht. Von einem Gen (TRI11) ist die Transkription ausschließlich im Vergleich zum Wildtyp 8/1 verstärkt, während von acht Genen (FGSG_03529, FGSG_03531, TRI3, TRI7, TRI10, TRI12, TRI13 und TRI14) die Transkription in Relation zu beiden Stämmen erhöht ist. Die Überexpression des TRI10 bewirkt eine verstärkte Transkription von zwei Genen (TRI5 und TRI14) nur im Vergleich zur Δ Gpmk1, einem Gen (TRI3) allein gegenüber dem Wildtyp 8/1 und fünf Genen (FGSG_03529, TRI4, TRI9, TRI11 und TRI13) im Verhältnis zu beiden Stämmen. Da allerdings das Schlüsselenzym TRI5 in beiden Überexpressionsmutanten keine Steigerung erfährt, welche über die Expression im Wildtyp 8/1 hinausgeht, ist eine Biosynthese von DON zu diesem Zeitpunkt unwahrscheinlich.

Die Erhöhung der Expression des TRI6 in der Δ Gpmk1 führt während der Pflanzeninfektion zu einer verstärkten Transkription von drei Genen (TRI4, TRI7 und TRI8) gegenüber der Δ Gpmk1 und von sechs Genen (FGSG_03530, TRI3, TRI5, TRI10, TRI12 und TRI14) im Vergleich zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1. Die Überexpression des TRI10 äußert sich durch einen Anstieg der Transkription von drei Genen (TRI5, TRI8 und TRI13) verglichen mit der Δ Gpmk1 und von sieben Genen (TRI3, TRI4, TRI7, TRI9, TRI11, TRI12 und TRI14) in Relation zum Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1. Die Überexpression führt bei beiden Mutanten zu einer verstärkten Transkription des Schlüsselenzyms TRI5.

In der TRI10-Mutante wird ein Wildtyp 8/1-ähnliches Niveau erreicht, während die Überexpression des TRI6 deutlich über die Transkriptionsstärke im Wildtyp 8/1 hinaus verstärkt wird. Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen den beiden Überexpressionsmutanten ist die gegenseitige Regulation der Transkriptionsfaktoren. Ausschließlich die Expression des TRI6 hat auch einen Einfluss auf die Transkriptionsstärke des TRI10. Eine umgekehrte Wirkung kann nicht beobachtet werden. Dies entspricht den Erkenntnissen bisheriger Studien, in denen ein regulatorischer Effekt der TRI6-Expression auf die Transkription des TRI10 beschrieben wurde (Peplow et al., 2003; Seong et al., 2009). Wird die geänderte Regulation der weiteren Gene des Sekundärmetabolit-Clusters im Myzel und während der Pflanzeninfektion zusammengefasst betrachtet, ist insbesondere in der TRI6-Überexpressionsmutante eine Wiederherstellung der Trichothecen-Biosynthese in der Δ Gpmk1 naheliegend. Um dies zu überprüfen wurde die DON-Konzentration während der Weizeninfektion untersucht. Diese zeigte, dass die Überexpression des TRI6 in der Δ Gpmk1 zu einer partiellen Restauration der Fähigkeit zur Trichothecen-Produktion führt. Die Mutante konnte etwa die Hälfte des Toxins bilden, welches der Wildtyp 8/1 im entsprechenden Zeitraum akkumulieren konnte. Die verstärkte Expression des TRI10 in der Δ Gpmk1 konnte die DON-Produktion hingegen nicht wieder ermöglichen. Dies spiegelt verschiedene Untersuchungen wider, welche TRI6 eine größere Bedeutung für die Regulation und Initiation der Mykotoxin-Synthese zusprechen (Proctor et al., 1995; Gardiner et al., 2009; Seong et al., 2009; Jiang et al., 2016)

Die Überexpression des TRI6 stellte weiterhin die Pathogenität der Δ Gpmk1 teilweise wieder her. Die Mutation führte zu einer Steigerung des Infektionsfortschritts um etwa 60% gegenüber dem Ursprungsstamm Δ Gpmk1. Allerdings verbleibt die Mutante mit ihrer Infektion hinter dem Wildtyp 8/1 zurück (-38 %). Diese Änderung der Virulenz lässt sich nicht alleine auf die Produktion von DON zurückführen. Die Deletion des TRI5 unterbricht die Biosynthese von DON vollständig, dennoch ist eine Penetration der Pflanzenoberfläche und eine Infektion des inokulierten Ährchens möglich (Maier et al., 2006; Boenisch, 2013). DON wird zwar während der frühen Infektionsphase in den Infektionskissen und invasiven Hyphen gebildet (Boenisch & Schäfer, 2011), ist allerdings erst zur Infektion des Blütenbodens eines Ährchens zwingende erforderlich (Jansen et al., 2005). Der Transkriptionsfaktor TRI6 besitzt zwei bisher bekannte Motive an denen eine Promotor-Bindung zur Regulation der Expression erfolgen kann. Die erste Sequenz ist YNAGGCC, welche in einem Bereich von 1000 bp der 5'-Region von 116 Genen vorhanden ist (Seong et al., 2009). Die zweite Erkennungssequenz besteht aus einem oder wiederholten GTGA-Abfolgen in der Promotor-Region. Diese ist bei 198 Genen auffindbar (Nasmith et al., 2011). Bei welcher der beiden Sequenzen zur Regulation der Transkriptionsfaktor TRI6 aktiv ist, wird durch die Wachstumsbedingungen und die Entwicklungsphase bestimmt.

Dabei wird vermutet, dass die Interaktion mit anderen Regulatoren wie TRI10 oder FgPac1 in einem Regulationskomplex eine entscheidende Rolle spielt (Seong et al., 2009; Merhej et al., 2011; Nasmith et al., 2011).

Von den GTGA-kontrollierten Genen sind in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 13 Gene gegenüber der Δ Gpmk1 hochreguliert, davon gehören fünf Gene zum TRI-Cluster (TRI3, TRI6, TRI7, TRI12 und TRI14). Das Protein TRI6 zeigt dabei eine Inhibition der eigenen Transkription, was die Existenz eines situationsbedingten selbstregulatorischen Mechanismus des Clusters bedeutet. Die übrigen Gene codieren unter anderem eine Cytochrom P450 MO (FGSG_00071), ein putatives pilzspezifisches Effektorprotein (FGSG_02109) und eine 1,3- β -Glucanase (FGSG_02408). Allgemein wird durch diese Regulation die Expression verschiedener Proteine des Stickstoff-Metabolismus, beispielsweise aus der GABA-Biosynthese (FGSG_08249), aus dem Lipid-Metabolismus, mit einem Bezug zu ROS sowie verschiedener Transkriptionsfaktoren und einer Adenylyl-Zyklase (FGSG_01923) kontrolliert (Nasmith et al., 2011). All diese Bereiche haben einen großen Einfluss auf die Virulenz von *F. graminearum*. Sowohl die Störung des GABA-Synthese, der lipolytischen Aktivität und des cAMP-Niveaus im Zellinneren reduzieren die Virulenz von *F. graminearum* auf Weizen erheblich (Feng et al., 2005; Bormann et al., 2014; Bönninghausen et al., 2015).

Durch die Sequenz YNAGGCC werden 29 Gene reguliert, welche in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 stärker transkribiert werden als in der Δ Gpmk1. Unter diesen sind sieben Gene des Clusters der Trichothecene-Biosynthese (TRI3, TRI4, TRI5, TRI8, TRI9, TRI11 und TRI14). Von den anderen regulierten Genen werden drei Cytochrom P450 MO (FGSG_00071, FGSG_07765 und FGSG_17598), zwei Dehydrogenasen (FGSG_02266 und FGSG_03936), zwei Rezeptoren des G-Protein-Signalwegs (FGSG_01806 und FGSG_03932) sowie eine Chitin-Deacetylase (FGSG_06549) codiert.

Grundsätzlich werden durch diesen Mechanismus verschiedene Proteine im Zusammenhang mit der Virulenz und Verteidigung, dem Kohlenstoff-Metabolismus, ROS und dem Sekundärmetabolismus reguliert (Seong et al., 2009). Zu den Proteinen der erstgenannten Kategorie gehören die toxisch wirkenden Kp4-Proteine Tox1 und Tox2 (FGSG_00060 und FGSG_00061). Ihre Wirkung erzielen diese Proteine durch die Inhibition von Kationen-Kanälen des Wirts (Gu et al., 1995). Allerdings sind auch Proteine, die der Detoxifikation dienen, Teil dieser Gruppe. Dazu zählen diverse ABC-Transporter und Major-Facilitator-Proteine. TRI6 kontrolliert zudem auch die Transkription von vier Genen der Siderophor-Biosynthese, wie das Protein NPS1 (FGSG_11026). Die Expression der Siderophore hat einen erheblichen Einfluss auf die Toleranz gegenüber ROS und die Virulenz von *F. graminearum* (Tobiasen et al., 2006; Oide et al., 2015).

Die verstärkte Induktion der Transkription all dieser Proteine durch die Überexpression des TRI6 könnte eine Bedeutung während des Infektionsprozesses besitzen und so die Virulenz der Δ Gpmk1 steigern.

Die veränderte Regulation dieser Gene führt außerdem zu einem Ausgleich der Anfälligkeit der Δ Gpmk1 gegenüber niedrigen Konzentrationen von NaCl (0,8 M). Die Zugabe des NaCl löst wie beim Wildtyp 8/1 eine Steigerung des Wachstums aus. Allerdings inhibieren geringe Mengen von H_2O_2 (10 mM) das Pilzwachstums stärker als beim Wildtyp 8/1 oder der Δ Gpmk1. Ebenso ist der Oxidationszustand in frisch gebildetem Myzel deutlich höher als in der Ursprungsmutante Δ Gpmk1. Diese Phänotypen der Überexpressionsmutante des TRI6 zeigen, dass die veränderte Regulation einen Einfluss auf das ROS-Gleichgewicht in *F. graminearum* besitzt.

Zusammengefasst hat nur die Überexpression des TRI6 einen Einfluss auf die Virulenz und DON-Produktion der Δ Gpmk1 auf Weizen. Trotz der Regulation verschiedener TRI-Cluster-Gene kann eine Überexpression des TRI10 die Trichothecen-Synthese in der Δ Gpmk1 nicht wiederherstellen. Im Gegensatz dazu bildet die TRI6-Mutante wieder etwa die Hälfte der Menge an Mykotoxin des Wildtyps 8/1. Da DON allerdings als alleiniger Faktor die teilweise restaurierte Virulenz nicht verursachen kann, spielt die Regulation der weiteren Ziele des TRI6 dabei eine wichtige Rolle. Daher wäre eine weitere Charakterisierung der Ziel-Gene des TRI6 ein weiterer Schritt, um das komplexe System der Virulenz von *F. graminearum* weiter aufzuklären. Hierfür wäre beispielsweise eine Transkriptionsanalyse der Gene in der TRI6-Überexpressionsmutante eine Möglichkeit. Auch die Erstellung von Mutanten kritisch erscheinender Proteine im Wildtyp 8/1 oder der Δ Gpmk1 könnte durchgeführt werden.

Um die mögliche Bedeutung der Interaktion von TRI6 und TRI10 näher zu beleuchten, könnte eine Charakterisierung der Überexpressionsmutanten in der Δ Gpmk1 bei zusätzlicher Ausschaltung des jeweils anderen Transkriptionsfaktors vorgenommen werden. Dies würde die Abhängigkeit des Regulationsmechanismus von TRI6 und TRI10 aufklären.

4.3.2 Deletion von vier putativen Effektorproteinen im Wildtyp 8/1

In *F. graminearum* ist über die Bedeutung von Effektorproteinen für eine erfolgreiche Infektion noch immer wenig bekannt. Daher ist es entscheidend putative Effektor-Kandidaten durch eine molekulare Charakterisierung weiter zu erforschen. Durch den Vergleich der Transkription von 524 putativen Effektorproteinen (PE) im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 konnten mehrere Proteine für diese Analyse ausgewählt werden. Darunter fielen die PE FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514, welche alle deutlich stärker in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 als in denen der Δ Gpmk1 transkribiert wurden. Das Gen FGSG_07026 war dabei der PE mit der höchsten differentiellen Expression. Es codiert ein *Fusarium*-spezifisches Protein mit 67 Aminosäuren und keinem Cystein ohne eine bekannte Domäne.

Der PE mit der zweit-stärksten Regulation ist FGSG_11047, ebenfalls ein *Fusarium*-spezifisches Protein mit 108 Aminosäuren und einem Cystein-Gehalt von 7,4 %. Das Gen mit der nächsthöchsten Transkription in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 ist FGSG_12514, welches auch ein *Fusarium*-spezifisches Protein mit 118 Aminosäuren und einem Cystein-Gehalt von 4,2 % codiert. Der letzte in dieser Arbeit untersuchte PE ist FGSG_02685. Er nimmt nur Position 18 der in den Infektionskissen der beiden Stämme differentiell regulierten Gene ein, wurde allerdings bereits durch eine Transkriptom-Analyse des Pilzmaterials von *F. graminearum* aus infiziertem Rachis-Gewebe von Weizen als PE identifiziert (Brown et al., 2017). Das Gen FGSG_02685 codiert ein pilzspezifisches Protein mit einer Größe von 147 Aminosäuren und einem Cystein-Gehalt von 5,4 %.

Aufgrund der hohen Expression dieser Effektoren in den Infektionskissen wurde eine Ausschaltung im Wildtyp 8/1 vorgenommen. Die erfolgreich erstellten Mutanten wurden durch eine Infektionsstudie auf Weizen auf mögliche Defizite während des Infektionsprozesses untersucht. Dabei zeigten alle Deletionsmutanten eine Infektion, die dem Wildtyp 8/1 entsprach.

Die ausgewählten PE FGSG_02685, FGSG_07026, FGSG_11047 und FGSG_12514 scheinen demnach keinen kritischen Einfluss auf die Virulenz von *F. graminearum* zu besitzen. Aufgrund der starken differentiellen Regulation gegenüber der avirulenten Δ Gpmk1 sollte eine zeitgleiche Deletion der PE in Betracht gezogen werden. Eventuell kann der Verlust eines einzelnen PE durch die Expression der übrigen PE kompensiert werden.

4.3.3 Deletion und Überexpression eines Proteins der gEgh16-Familie im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1

Das Gen FGSG_00006 codiert ein Protein, welches eine Domäne 3129 mit unbekannter Funktion (DUF3129) beinhaltet und daher verwandt mit einem Protein der gEgh16-Familie ist. Diese Familie ist spezifisch für filamentöse pathogene Pilze. Von Genen dieser Familie sind insgesamt vier Gene in *F. graminearum* vorhanden (FGSG_00006, FGSG_04647, FGSG_08021 und FGSG_09353), welche im Wildtyp 8/1 alle eine verstärkte Transkription während der Weizeninfektion zeigen. Drei Gene sind zudem deutlich gegenüber den Laufhyphen in den Infektionskissen hochreguliert. Einzig das Gen FGSG_00006 wird in den beiden Zelltypen auf gleichem Niveau transkribiert. Diese Transkriptionsverteilung in der Familie der gEgh16-Gene wurde bereits in *Blumeria graminis* beobachtet. Auch hier zeigte sich die größtenteils konstante Transkription eines Gens sowie die gesteigerte und abfallende Transkription weiterer Gene dieser Familie während des Infektionsverlaufs (Grell et al., 2003). Daher sollte untersucht werden, welche spezielle Rolle das gEgh16-Protein FGSG_00006 einnimmt.

Die Ausschaltung der Gpmk1 führt dazu, dass keine Expression der gEgh16-Gene stattfindet. Dies kann mit der fehlenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors FgSte12 (FGSG_07310) durch die Gpmk1 erklärt werden. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert in verschiedenen pathogenen Pilzen direkt die Expression von gEgh16-Genen (Xue et al., 2002; Huang et al., 2019). Dafür befindet sich FgSte12 im Wildtyp-Stamm im Zellkern. Die Ausschaltung der Gpmk1 bewirkt, dass FgSte12 hingegen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Gu et al., 2015). Die Transkriptom-Daten zeigen zudem, dass sich die Transkription des FgSte12-codierenden Gens zwischen Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 nicht unterscheidet. Dies stützt die Beobachtung, dass die veränderte Verteilung in der Zelle ein Grund für den Funktionsverlust des FgSte12 ist.

Zur Charakterisierung des FGSG_00006 wurde eine Ausschaltung im Wildtyp 8/1 sowie eine Überexpression in beiden Stämmen vorgenommen.

Die Überexpression des Gens führte im Wildtyp 8/1 zu einer stark reduzierten Rate mit der Konidien gebildet werden. Gegenüber dem Wildtyp 8/1 konnte die Mutante nur noch die Hälfte der Konidien generieren. Hingegen führte die Deletion im Wildtyp 8/1 zu einer erhöhten Produktion von Konidien. In *B. graminis* konnte gezeigt werden, dass die Transkription eines Gens der gEgh16-Familie während der Keimung von Konidien deutlich erhöht ist (Justesen et al., 1996; Grell et al., 2003). Die beobachteten Veränderungen in der Produktion von Konidien lassen vermuten, dass es sich bei FGSG_00006 um einen hemmenden Faktor bei der Auskeimung von Konidien handelt. Eventuell wird ein Signal nach erfolgter Auskeimung durch das gEgh16-Protein vermittelt, welches weitere unkontrollierte Auskeimungsereignisse vorerst unterbindet.

Obwohl nach 3 Tagen keine Transkription des FGSG_00006 im Myzel des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 festgestellt werden konnte, bewirkt die Deletion des Gens im Wildtyp 8/1 eine Steigerung des allgemeinen Wachstums. Dies bedeutet, dass das Gen im Wildtyp 8/1 zu einem früheren Zeitpunkt transkribiert werden muss und das exprimierte Protein das Wachstum negativ beeinflusst. In *B. graminis* konnte Transkript des ersten beschriebenen gEgh16-Gens während der frühen Wachstumsphase nachgewiesen werden. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte jedoch keine Transkription mehr nachgewiesen werden, daher wurde eine Funktion während des initialen Hyphenwachstums angenommen (Justesen et al., 1996). Dies könnte auch die gesteigerte Konidienproduktion der Ausschaltung des FGSG_00006 erklären, wenn die Deletion einen positiven Effekt auf die Bildung frischen Myzels besitzt.

Dennoch führte die Überexpression des Gens zu keinem reduzierten Wachstum des Wildtyps 8/1 oder der Δ Gpmk1. Auch in den Pathogenen *Metarhizium acridum* und *M. grisea* wurde durch die Ausschaltung von Genen der gEgh16-Familie kein negativer Effekt auf das generelle Wachstum nachgewiesen (Xue et al., 2002; Cao et al., 2012).

Sowohl die Deletion als auch die Überexpression des FGSG_00006 führte im Wildtyp 8/1 zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber osmotischem sowie oxidativem Stress. Diese ist bei Ausschaltung des Gens stärker als bei einer Überexpression. Zudem führt die Überexpression nur zu einer Verringerung der Anfälligkeit des Wildtyps 8/1 bei induziertem oxidativem Stress durch höhere Konzentrationen von H₂O₂ (20 mM).

Die Überexpression des FGSG_00006 in der Δ Gpmk1 führte hingegen nur zu einer Wiederherstellung des wachstumsfördernden Effektes der Zugabe von NaCl in niedrigen Konzentrationen (0,8 M), welcher durch die Ausschaltung der Gpmk1 verloren wurde. Oxidativer Stress führte hingegen zu einer stärkeren Verringerung des Wachstums gegenüber der Δ Gpmk1 ohne Überexpression des gEgh16-Gens. Diese gesteigerte Sensibilität der Δ Gpmk1 könnte ein weiteres Indiz für die regulatorische Funktion des FGSG_00006 darstellen. Da in der Δ Gpmk1, neben vielen weiteren Genen, kein Gen der gEgh16-Familie exprimiert wird, kann einer potentiellen Wirkung des FGSG_00006 auf die Aktivität oder Expression Stress-bezogener Proteine nicht entgegengewirkt werden. Dies führt daher zu der erhöhten Sensibilität. Dass die Deletion sowie die Überexpression des FGSG_00006 eine gesteigerte Toleranz gegenüber den Stressoren im Wildtyp 8/1 zeigt, lässt vermuten, dass das gEgh16-Protein durch seine DUF3129 manche Gene oder deren codierte Proteine sowohl positiv als auch negativ beeinflussen kann. Zu den betroffenen Proteinen könnte beispielsweise die FgHOG1/FgOS-2 gehören. Eine gesteigerte Expression dieses Proteins könnte die erhöhte Toleranz bei hyperosmotischen Bedingungen verursachen, da diese Teil der Bewältigung von osmotischem Stress in *F. graminearum* ist (Nguyen et al., 2012; Zheng et al., 2012). Bezüglich des induzierten oxidativen Stresses ist unter anderem die Expression von Katalasen von Bedeutung. Diese dienen dem enzymatischen Abbau von H₂O₂ und können so bei verstärkter Expression eine gesteigerte Toleranz gegenüber oxidativem Stress auslösen (Ponts et al., 2007; Hansberg et al., 2012). Im Allgemeinen konnte so jedoch festgestellt werden, dass das gEgh16-Protein FGSG_00006 einen Einfluss auf die Stresstoleranz von *F. graminearum* besitzt. Dies wurde bisher bei keinem anderen Pathogen gezeigt. Ausschließlich eine Untersuchung des gEgh16-Protein-regulierenden Transkriptionsfaktors MaSte12 in dem entomopathogenen Pilz *M. acridum* beschreibt, dass eine Ausschaltung dieses Gens zu keiner Änderung der Stresstoleranz gegenüber osmotischem oder oxidativem Stress führt (Wei et al., 2017). Allerdings wurde hier nur eine für *F. graminearum* eher geringe Konzentration von H₂O₂ (6 mM) getestet. Zudem ist nicht bekannt welche regulatorische Auswirkung die Deletion des MaSte12 auf Gene der Stressantwort besitzt.

Sowohl die Ausschaltung als auch die Überexpression des FGSG_00006 im Wildtyp 8/1 führte zu einer wesentlich geringeren Präsenz von ROS im frisch gebildeten Myzel der Wachstumszone.

Weiterhin führte die Deletion zu einer allgemein verringerten Akkumulation von ROS im gesamten Myzel des Wildtyps 8/1. Diese Eigenschaft deckt sich mit der gesteigerten Toleranz des Wildtyps 8/1 gegenüber oxidativem Stress durch die Modifikation der Expression des FGSG_00006. Das insgesamt verringerte Oxidationspotential im Myzel zeigt ebenfalls eine veränderte Aktivität ROS produzierender oder abbauender Enzyme in *F. graminearum*.

Während der Infektion von Weizen äußert sich die Modifikation der Expression des FGSG_00006 am deutlichsten. Die Überexpression im Wildtyp 8/1 ist ausschließlich in der Lage das inokulierte Ährchen zu infizieren und kann nicht in die Rachis vordringen. Dieser Phänotyp wird ebenfalls durch die Ausschaltung verschiedener Gene, welche die DON-Biosynthese in *F. graminearum* unterbrechen, verursacht (Maier et al., 2006; Kim et al., 2014). Jedoch zeigte die mikroskopische Betrachtung der Oberfläche infizierter Paleae, dass die Überexpressionsmutante keine Infektionsstrukturen bildet und somit die Pflanze lediglich mit einem Netzwerk aus Laufhyphen besiedelt. Dieses Erscheinungsbild gleicht dem der Δ Gpmk1 auf Glumae von Weizen, da diese dort keine Infektionskissen bilden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Genen in den Infektionskissen hochreguliert werden. Diese Vorbereitung auf die Infektion der Wirtspflanze kann ohne Infektionsstrukturen in dieser Mutante nicht stattfinden. Das Mykotoxin DON ist beispielsweise bereits in der frühen Infektionsphase von entscheidender Bedeutung und dessen Synthese wird in den Infektionskissen induziert (Boenisch & Schäfer, 2011; Glasenapp, 2017). Ebenso dienen Infektionskissen als Ballungsraum von Penetrationsstellen der pflanzlichen Oberfläche (Boenisch, 2013). Die Proteine der gEgh16-Familie stehen ebenfalls in Verbindung zum Penetrationsprozess des Wirtsorganismus verschiedener Pathogene. Eine Deletion der gEgh16-Gene führte in *M. robersii*, *M. acridum* und *M. grisea* dazu, dass keine Penetration mehr stattfinden konnte. Dies wurde durch den Verlust des Penetrationsstiftes der klassischen Appressorien dieser Pilze ausgelöst (Xue et al., 2002; Cao et al., 2012; Huang et al., 2019). Der vollständige Verlust von Appressorien konnte lediglich durch die Ausschaltung des Transkriptionsfaktors MaSte12 in *M. acridum* induziert werden (Wei et al., 2017). Dieser induziert, wie weitere Regulatoren der Ste12-Gruppe, unter anderem die Expression der gEgh16-Gene. Wenn das gEgh16-Protein FGSG_00006 in *F. graminearum* eine regulatorische und, in diesem Fall, inhibierende Wirkung auf die Transkription weiterer gEgh16-Gene besitzt, würde eine Überexpression zu einer fehlenden Expression dieser Gene führen. Da diese für die Funktion und Bildung von Infektionsstrukturen eine Rolle spielen, könnte dies den Phänotyp der Überexpression im Wildtyp 8/1 erklären. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch gestützt, dass eine Deletion des Gens FGSG_00006 zu einer signifikanten Hypervirulenz des Wildtyp 8/1 auf einem nahezu infektionsresistenten Weizenkultivar führt. Auf der Pflanzenoberfläche wird während der Infektion eine deutlich gesteigerte Anzahl von Infektionskissen gebildet.

Diese waren zudem um ein vielfaches vergrößert und stärker verzweigt. Das Fehlen des inhibitorisch wirkenden gEgh16-Proteins führt daher zu einem erhöhten Wachstum des Pilzes, welcher so einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Wirtspflanze gewinnt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es sich bei dem gEgh16-Protein FGSG_00006 um ein Enzym mit einer regulatorischen Funktion handelt. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die konstante Transkription während des Infektionsprozesses im Wildtyp 8/1 gestützt, da ein Großteil der Transkriptionsfaktoren von *F. graminearum* ebenfalls während dieser Phase nicht differentiell reguliert wird. Dass gEgh16-Proteine verschiedene Funktionen einnehmen können und nicht zwangsläufig eine pathogenitätsbezogene Wirkung haben müssen, wurde bereits in *M. robersii* gezeigt (Huang et al., 2019). Dennoch bleibt die Funktionsweise der gEgh16-Proteine und ihrer DUF3129 weiterhin unbekannt. Zur weiteren Untersuchung des FGSG_00006 sollten Transkriptionsprofile der übrigen drei gEgh16-Gene in *F. graminearum* in den Mutanten mit einer Deletion bzw. Überexpression des FGSG_00006 erstellt werden. Zudem sollte eine mögliche Wechselwirkung zwischen dem Transkriptionsfaktor FgSte12 und den gEgh16-Genen und deren codierten Proteinen untersucht werden. Eine fluoreszenzgestützte Lokalisationsstudie zu den gEgh16-Proteinen könnte ebenfalls eine mögliche Antwort auf den Ort der Wirkung und somit den Zielen der Proteine bieten.

4.3.4 Überexpression der Regulatoren des G-Protein-Signalwegs FgFlbA und FgFlbB im Wildtyp 8/1

Der G-Protein-Signalweg spielt in vielen Organismen, wie auch in *F. graminearum*, eine entscheidende Rolle in der Regulation verschiedener Prozesse. In *F. graminearum* kontrolliert dieser unter anderem verschiedene Entwicklungsprozesse sowie die Mykotoxin-Produktion und beeinflusst somit die generelle Virulenz des Pathogens. Zur Reaktion auf äußere Signale und der Aktivierung des Signalwegs dient die Proteinfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die Regulatoren des G-Protein-Signalwegs (RGS) wirken als intrazelluläres Gegenstück zu GPCR, da sie generell zur Inaktivierung von G-Proteinen beitragen (Hicks, 1997; Yu et al., 1996; De Vries et al., 2000; Yu, 2006).

Insgesamt werden in *F. graminearum* acht dieser RGS codiert. Nur zwei davon (FGSG_03597 und FGSG_16620) werden jedoch bei einem Vergleich des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 differentiell reguliert. Dabei handelt es sich um zwei RGS mit jeweils zwei DEP-Domänen, welche ebenfalls in den drei namensgebenden Regulator-Proteinen Dishevelled, Egl-10 und Pleckstrin vorhanden sind, und der spezifischen RGS-Domäne. Damit sind beide Gene Paraloge zu dem RGS FlbA aus *A. nidulans* und werden daher als FgFlbA (FGSG_16620) und FgFlbB (FGSG_03597) bezeichnet (Mukherjee et al., 2011; Park et al., 2012). In *A. nidulans* ist die $G\alpha$ -Untereinheit FadA eines G-Proteins eines der Ziele des FlbA.

Auch in *F. graminearum* wird das Homolog zur FadA GzGPA1 (FGSG_05535) durch den Regulator FgFlbA inhibiert. Die Untereinheit GzGPA1 gilt dabei als Inhibitor der Aktivität von Adenyl-zyklasen (Hicks, 1997; Yu et al., 2008).

Im Vergleich mit dem Wildtyp 8/1 ist das FgFlbB in den Laufhyphen der Δ Gpmk1 hochreguliert und tendenziell stärker in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 transkribiert. Das FgFlbA ist hingegen nur in den Infektionskissen der Δ Gpmk1 hochreguliert. Diese Regulation könnte durch die fehlende Phosphorylierung dieser RGS-Proteine durch die Gpmk1 ausgelöst sein. In *S. cerevisiae* wird der RGS Sst2, das Homolog zu FgFlbA, durch die Proteinkinase Fus3, dem Homolog der Gpmk1, phosphoryliert und somit der gekoppelte G-Protein-Signalweg deaktiviert (Parnell et al., 2005). Da dieser Prozess in der Δ Gpmk1 von *F. graminearum* nicht mehr stattfinden kann, wäre eine erhöhte Transkription der Gene von FgFlbA und FgFlbB eine Reaktion auf die ausbleibende regulatorische Wirkung der codierten Proteine. Durch eine Überexpression dieser beiden Proteine im Wildtyp 8/1 sollte dieser Zustand artifiziell hervorgerufen werden, um die Bedeutung der inhibitorischen Wirkung auf den G-Protein-Signalweg während der Entwicklung und dem Infektionsprozess näher zu untersuchen.

Die Überexpression des FgFlbA führte zu einer deutlichen Reduktion der Konidienproduktion. Im Vergleich zum Wildtyp 8/1 werden weniger als die Hälfte der Konidien gebildet. Dies konnte in einer zuvor durchgeführten Studie nicht dokumentiert werden (Park et al., 2012). Zur Induktion der Konidienproduktion wurde in dieser Studie ein Medium verwendet, welches durch die Zugabe von verschiedenen Salzen und Hefeextrakt die Bildung der Konidien wesentlich unterstützt (Cappellini & Peterson, 1965). Somit könnte ein Effekt der Überexpression des FgFlbA auf die Konidienproduktion in einem natürlicheren, rein aus Pflanzenmaterial hergestellten, Induktionsmedium maskiert werden. Dieser Unterschied könnte jedoch zeigen, dass die Mutante eine Veränderung im Stickstoff-Metabolismus erfahren hat. Die verstärkte Expression des FgFlbB hat hingegen keinen Einfluss auf die asexuelle Reproduktion.

Das allgemeine Wachstum auf Festmedium wurde nur durch die Überexpression des FgFlbA gegenüber dem Wildtyp 8/1 leicht erhöht. Der Zusammenhang von FlbA und dem vegetativen Wachstum wurde unter anderem bereits in *A. nidulans* und *F. graminearum* beobachtet (Lee & Adams, 1994; Yu et al., 1996; Park et al., 2012). Dieser wird durch die regulative Funktion des FlbA gegenüber der FadA (GzGAP1) hergestellt. Die verstärkte Expression des FlbA stimuliert den FadA-vermittelten Signalweg und löst so eine gesteigerte GTPase-Aktivität im inneren der Zellen aus (Shimizu & Keller, 2001; Yu, 2006).

Sowohl die Überexpression des FgFlbA als auch die des FgFlbB führen bei der Zugabe von 0,8 M NaCl zu einer verstärkten positiven Wirkung auf das Wachstum. Auch die Verabreichung einer Stress-induzierenden Konzentration von NaCl reduzierte das Wachstum der Überexpressionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp 8/1 deutlich weniger.

Sie waren somit toleranter gegenüber osmotischem Stress. In *A. nidulans* konnte durch die Zugabe von 0,8 M NaCl die Reduktion des Wachstums und die fehlende Konidienbildung durch eine Deletion des FlbA wiederhergestellt werden und zu Wildtyp-ähnlichen Eigenschaften führen (Lee & Adams, 1994). Die Reaktion auf veränderte osmotische Bedingungen steht also in einer Beziehung mit der Expression des RGS FlbA. Auch auf oxidativen Stress durch höhere Konzentrationen von H₂O₂ (15 mM und 20 mM) reagiert die Überexpressionsmutante des FgFlbA weniger sensitiv als der Wildtyp 8/1. Die Mutante des FgFlbB zeigt hingegen eine verringerte Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen von H₂O₂ (20 mM). Die Unterschiede in der Reaktion auf diese beiden Auslöser des Stresses könnten eine zusätzliche Wirkung der RGS-Proteine auf den Signalweg der MAPK FgOS-2 bedeuten. Die FgOS-2 wird durch äußeren Stress aktiviert und spielt in der Regulation von ROS-abbauenden Enzymen eine wichtige Rolle (Nguyen et al., 2012). Auch eine Modifikation der Zellwand des Pilzes, welche durch die Überexpression ausgelöst wurde, könnte eine erhöhte Toleranz gegenüber äußerem Stress bewirken. Verschiedene Studien zeigten den Bezug der FlbA zu der Integrität der Zellwand (Yu et al., 2008; Zhang et al., 2011; Park et al., 2012).

Das neu gebildete Myzel in den Wachstumszonen der Überexpressionsmutanten des FgFlbA und FgFlbB wies bei einer Detektion von ROS einen deutlich geringeren Oxidationszustand auf als der Wildtyp 8/1. Auch in dem älteren Myzel der Kolonien wurde weniger ROS akkumuliert. Insbesondere im Myzel der Überexpression des FgFlbB konnte nahezu kein ROS detektiert werden. Diese Beobachtungen und die gesteigerte Toleranz gegenüber äußerlich appliziertem H₂O₂ spricht für eine gesteigerte Aktivität von Enzymen der Detoxifikation von ROS in den Überexpressionsmutanten. Die Expression der zuvor genannten FgOS-2 kontrolliert direkt die Transkription und Aktivität von Katalasen, welche H₂O₂ in Wasser und Sauerstoff umwandeln (Nguyen et al., 2012). Die Involvierung in den Signalweg dieser MAPK ist daher nicht auszuschließen.

Während der Infektion von Weizen führte die Überexpression des FgFlbB zu einer deutlichen Hypervirulenz. Die Mutante war in der Lage etwa 80 % einer Ähre eines nahezu infektionsresistenten Weizenkultivars zu infizieren. Die Infektion durch den Wildtyp 8/1 konnte sich im gleichen Zeitraum nur auf etwa 10% der Ähre ausbreiten. Auf mikroskopischer Ebene konnte bei einer Infektion durch die Überexpressionsmutante beobachtet werden, dass die Pflanzenoberfläche ein im Vergleich zum Wildtyp 8/1 wesentlich dichteres Netzwerk aus Laufhyphen gebildet hat. Auch die Frequenz, mit der Infektionskissen angelegt wurden, war deutlich erhöht. Die gelappten Appressorien und Infektionskissen von *F. graminearum* waren durch die Überexpression des FgFlbB um ein Vielfaches vergrößert.

Die Überexpression des Paralogs zu FlbA führt zu einer verstärkten Inhibition des GzGAP1 und somit zu einer erhöhten Aktivität von Adenylyl-Zyklasten. Ein gesteigertes interzelluläres cAMP-Niveau löst bei *M. grisea* die Bildung von Appressorien aus (Lee & Dean, 1993; Choi & Dean, 1997). Auch bei *F. graminearum* ist die Produktion von cAMP und somit die Aktivität von Adenylyl-Zyklasten von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung komplexer Infektionsstrukturen (Bormann et al., 2014). Das angenommene gesteigerte Niveau des zellinternen cAMP in der Überexpression des FgFlbB induziert folglich die Formierung von Infektionskissen während der Infektion von Weizen. Durch das zusätzlich gesteigerte Wachstum durch die verstärkte GTPase-Aktivität entwickeln sich das Laufhyphennetzwerk und die Infektionsstrukturen deutlich ausgeprägter als beim Wildtyp 8/1 (Shimizu & Keller, 2001; Yu, 2006). Zudem kann angenommen werden, dass die verstärkte Expression des FgFlbB zusätzlich eine Auswirkung auf die Produktion des Mykotoxins DON hat.

Durch die Ausschaltung der GzGAP1 wurde die DON-Biosynthese um einen wesentlichen Anteil verstärkt (Yu et al., 2008). Auch dies lässt sich mit einem gesteigerten cAMP-Niveau erklären, da ein niedriger cAMP-Gehalt im Zellinneren die Produktion von DON während der Infektion verhindert (Bormann et al., 2014). Zudem spielt FlbA in *A. nidulans* durch Interaktion mit verschiedenen regulatorisch wirkenden Proteinen eine Rolle in der Aktivierung der Mykotoxin-Produktion (Hicks, 1997). Der RGS FlbA hat zudem die Funktion die Expression des Transkriptionsfaktors Ste12 zu induzieren (Lee & Adams, 1994; Yu et al., 1996). Dieser dient der Aktivierung von Proteinen der gEgh16-Familie, welche einen starken Bezug zur Virulenz von Pathogenen aufweisen (Xue et al., 2002; Huang et al., 2019). Sie sind maßgeblich an der Fähigkeit zur Penetration der Wirtsoberfläche beteiligt (Park et al., 2002; Xue et al., 2002; Park et al., 2004; Cao et al., 2012; Wei et al., 2017; Huang et al., 2019). Daher ist auch ein gesteigerter Effekt durch die erhöhte Expression des FgSte12 und den gEgh16-Proteinen in *F. graminearum* nicht auszuschließen. All dies könnte die natürliche Resistenz von Weizenpflanzen des Kultivars 'Amaretto' überwältigen und somit zu der erfolgreichen Infektion führen.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der beiden Paraloge zu FlbA in *F. graminearum*, FgFlbA und FgFlbB, dass sie eine entscheidende Rolle in der Reaktion auf Stress einnehmen, sowie, dass die Expression des FgFlbB eine bedeutende Funktion in der Infektion von Weizen ausübt. Da sich insbesondere die Inhibition der GzGAP1 auf den Phänotyp der Überexpressionsmutanten auszuwirken scheint, sollte in einer weiteren Untersuchung das zellinterne cAMP-Niveau bestimmt werden. Auch die Expression und Aktivität von Proteinen mit einer Verbindung zu ROS sollte näher betrachtet werden. Eine rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Pflanzenoberfläche nach einer Infektion würde den Infektionsprozess der Überexpressionsmutante des FgFlbB weiter beleuchten. So könnte eine mögliche Steigerung der Rate von Penetrationsereignissen nachgewiesen werden.

4.4 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Transkription der Gene von *F. graminearum* im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1 maßgeblich unterscheidet.

So konnten Theorien entwickelt werden, welche die Ursache für die Apathogenität der Δ Gpmk1 weitergehend begründet. Insbesondere die differentielle Expression der Gene, welche Proteine aus den funktionellen Kategorien der GPCR, DH, TP, TF, RRE, PE und CAZy codieren, trägt zu dem Phänotyp der Mutante bei. Die in der Δ Gpmk1 verringert transkribierten GPCR tragen beispielsweise weitgehend zu der Wahrnehmung der Wirtspflanze durch den Pilz bei, was die Fähigkeit zur Penetration der Pflanze stark beeinflusst. Die Expression von TP hat unter anderem einen Effekt auf die Produktion und Sekretion von Sekundärmetaboliten wie dem Pigment Aurofusarin. Eine veränderte Regulation von TF kann ebenfalls weitreichende Folgen auf die Virulenz von *F. graminearum* besitzen. In diesem Bereich können selbst kleine Unterschiede durch die Multifunktionalität vieler TF eine große Wirkung erzielen, da TF an nahezu allen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. In der Interaktion zwischen der Wirtspflanze und dem pathogenen Pilz nehmen RRE und PE eine wichtige Rolle ein. Sie dienen der negativen Beeinflussung der Pflanze, aber auch dem Schutz des Pilzes gegen die Verteidigungsmechanismen der Wirtspflanze. Zusammen mit unter anderem DH und CAZy sind RRE an der Nutzung pflanzlicher Substanzen als Nährstoffquelle für den Pilz verantwortlich. Die Transkription von Genen dieser Kategorien nimmt auch starken Einfluss auf die Funktionalität von Infektionskissen. Diese gelten im Wildtyp als ein transkriptionelles Zentrum für unter anderem Enzyme mit einer lytischen Funktion und sind für die erfolgreiche Infektion notwendig.

Weiterhin konnte der Einfluss des gEgh16-Proteins FGSG_00006 sowie von TRI6, einem der TF des Sekundärmetabolit-Clusters der Trichothecene-Biosynthese, und des Regulators des G-Protein-Signalwegs FgFlbB auf die Virulenz von *F. graminearum* auf Weizen weiter beleuchtet werden.

All dies zeigt, dass die Apathogenität der Δ Gpmk1 nicht ausschließlich durch einen Faktor verursacht wird, sondern dass die Deletion der Gpmk1 die Expression von Proteinen aus verschiedenen funktionellen Gruppen beeinflusst. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass es möglich ist in dieser Fülle an Proteinen einzelne Kandidaten zu identifizieren, welche die Virulenz von *F. graminearum* mitbestimmen. Die transkriptomgestützte Untersuchung des frühen Infektionsprozesses von *F. graminearum* auf Weizen und der Vergleich des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 konnten somit erfolgreich zur weiteren Analyse dieses komplexen Vorgangs beitragen und stellen zudem die Grundlage für weiterführende Forschung.

5. Literatur

- Agger, J. W., Isaksen, T., Varnai, A., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Ludwig, R., Horn, S. J., Eijssink, V. G. H., & Westereng, B. (2014). Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6287–6292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323629111>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>
- Ali, S. S., Khan, M., Fagan, B., Mullins, E., & Doohan, F. M. (2012). Exploiting the inter-strain divergence of *Fusarium oxysporum* for microbial bioprocessing of lignocellulose to bioethanol. *AMB Express*, 2(1), 16. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-16>
- Ali, S. S., Nugent, B., Mullins, E., & Doohan, F. M. (2013). Insights from the Fungus *Fusarium oxysporum* Point to High Affinity Glucose Transporters as Targets for Enhancing Ethanol Production from Lignocellulose. *PLoS ONE*, 8(1), e54701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054701>
- Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Verbrugghe, E., Vandenbroucke, V., Li, S., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2014). The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. *Toxins*, 6(2), 430–452. <https://doi.org/10.3390/toxins6020430>
- Babadoost, M. (2018). *Fusarium: Historical and Continued Importance*. In T. Askun (Hrsg.), *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74147>
- Bahadoor, A., Schneiderman, D., Gemmill, L., Bosnich, W., Blackwell, B., Melanson, J. E., McRae, G., & Harris, L. J. (2016). Hydroxylation of Longiborneol by a *C1m2* -Encoded CYP450 Monooxygenase to Produce Culmorin in *Fusarium graminearum*. *Journal of Natural Products*, 79(1), 81–88. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00676>

- Bakker, M. G., Brown, D. W., Kelly, A. C., Kim, H.-S., Kurtzman, C. P., McCormick, S. P., O'Donnell, K. L., Proctor, R. H., Vaughan, M. M., & Ward, T. J. (2018). *Fusarium* mycotoxins: a trans-disciplinary overview. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 161–171. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1433720>
- Bashir, Z., Ahmad, A., Shafique, S., Anjum, T., Shafique, S., & Akram, W. (2013). Hypersensitive response — A biophysical phenomenon of producers. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(2), 105–110. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.2.3>
- Beeson, W. T., Phillips, C. M., Cate, J. H. D., & Marletta, M. A. (2012). Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 890–892. <https://doi.org/10.1021/ja210657t>
- Bertero, A., Moretti, A., Spicer, L., & Caloni, F. (2018). *Fusarium* Molds and Mycotoxins: Potential Species-Specific Effects. *Toxins*, 10(6), 244. <https://doi.org/10.3390/toxins10060244>
- Bluhm, B. H., Zhao, X., Flaherty, J. E., Xu, J.-R., & Dunkle, L. D. (2007). *RAS2* Regulates Growth and Pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 627–636. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0627>
- Blümke, A., Falter, C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schäfer, W., Feussner, I., & Voigt, C. A. (2014). Secreted Fungal Effector Lipase Releases Free Fatty Acids to Inhibit Innate Immunity-Related Callose Formation during Wheat Head Infection. *Plant Physiology*, 165(1), 346–358. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236737>
- Boddy, L., Wood, J., Redman, E., Hynes, J., & Fricker, M. D. (2010). Fungal network responses to grazing. *Fungal Genetics and Biology*, 47(6), 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.01.006>
- Boedi, S., Berger, H., Sieber, C., Münsterkötter, M., Maloku, I., Warth, B., Sulyok, M., Lemmens, M., Schuhmacher, R., Güldener, U., & Strauss, J. (2016). Comparison of *Fusarium graminearum* Transcriptomes on Living or Dead Wheat Differentiates Substrate-Responsive and Defense-Responsive Genes. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01113>

- Boenisch, M. J. (2013). *Structural and molecular characterisation of the penetration process of Fusarium graminearum during fusarium head blight infection*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Boenisch, M. J., & Schäfer, W. (2011). Fusarium graminearum forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, 11, 110. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-110>
- Bölker, M. (1998). Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 25(3), 143–156. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1102>
- Bönnighausen, J., Gebhard, D., Kröger, C., Hader, B., Tumforde, T., Lieberei, R., Bergemann, J., Schäfer, W., & Bormann, J. (2015). Disruption of the GABA shunt affects mitochondrial respiration and virulence in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*: GABA metabolism and pathogenic development. *Molecular Microbiology*, 98(6), 1115–1132. <https://doi.org/10.1111/mmi.13203>
- Bormann, J., Boenisch, M. J., Brückner, E., Firat, D., & Schäfer, W. (2014). The Adenylyl Cyclase Plays a Regulatory Role in the Morphogenetic Switch from Vegetative to Pathogenic Lifestyle of Fusarium graminearum on Wheat. *PLoS ONE*, 9(3), e91135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091135>
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Reboutier, D., Madiona, K., Pennarun, A. M., Monestiez, M., Trouverie, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J. P., Ouhdouch, Y., El Hadrami, I., & Bouteau, F. (2006). Early physiological responses of Arabidopsis thaliana cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytologist*, 169(1), 209–218. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01561.x>
- Brown, N. A., Antoniwi, J., & Hammond-Kosack, K. E. (2012). The Predicted Secretome of the Plant Pathogenic Fungus Fusarium graminearum: A Refined Comparative Analysis. *PLoS ONE*, 7(4), e33731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033731>

- Brown, N. A., Evans, J., Mead, A., & Hammond-Kosack, K. E. (2017). A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection: Transcriptome of symptomless *Fusarium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 18(9), 1295–1312. <https://doi.org/10.1111/mpp.12564>
- Cabrera, I. E., Pacentine, I. V., Lim, A., Guerrero, N., Krystofova, S., Li, L., Michkov, A. V., Servin, J. A., Ahrendt, S. R., Carrillo, A. J., Davidson, L. M., Barsoum, A. H., Cao, J., Castillo, R., Chen, W.-C., Dinkchian, A., Kim, S., Kitada, S. M., Lai, T. H., Mach, A., Malekyan, C., Moua, T. R., Torres, C. R., Yamamoto, A., & Borkovich, K. A. (2015). Global Analysis of Predicted G Protein–Coupled Receptor Genes in the Filamentous Fungus, *Neurospora crassa*. *G3; Genes|Genomes|Genetics*, 5(12), 2729–2743. <https://doi.org/10.1534/g3.115.020974>
- Cambaza, E. (2018). Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. *Foods*, 7(10), 165. <https://doi.org/10.3390/foods7100165>
- Cameron, M. D., & Aust, S. D. (2001). Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(2–3), 129–138.
- Cao, Y., Zhu, X., Jiao, R., & Xia, Y. (2012). The Magas1 Gene is Involved in Pathogenesis by Affecting Penetration in *Metarhizium acridum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(7), 889–893. <https://doi.org/10.4014/jmb.1111.11055>
- Cappellini, R. A., & Peterson, J. L. (1965). Macroconidium Formation in Submerged Cultures by a Non-Sporulating Strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 57(6), 962. <https://doi.org/10.2307/3756895>
- Cho, M.-H., & Lee, S.-W. (2015). Phenolic Phytoalexins in Rice: Biological Functions and Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29120–29133. <https://doi.org/10.3390/ijms161226152>
- Choi, M., & Davidson, V. L. (2011). Cupredoxins—A study of how proteins may evolve to use metals for bioenergetic processes. *Metallomics*, 3(2), 140. <https://doi.org/10.1039/c0mt00061b>

- Choi, W., & Dean, R. A. (1997). The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *The Plant Cell*, 9(11), 1973–1983. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1973>
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., & Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110(1), 119–122. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90454-W](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90454-W)
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., & Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10352–10357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601456103>
- Comménil, P., Belingheri, L., & Dehorter, B. (1998). Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52(1), 1–14. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1997.0130>
- Corrales Escobosa, A. R., Rangel Porras, R. A., Meza Carmen, V., Gonzalez Hernandez, G. A., Torres Guzman, J. C., Wrobel, K., Wrobel, K., Roncero, M. I. G., & Gutierrez Corona, J. F. (2011). *Fusarium oxysporum* Adh1 has dual fermentative and oxidative functions and is involved in fungal virulence in tomato plants. *Fungal Genetics and Biology*, 48(9), 886–895. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.06.004>
- Covert, S. F., Enkerli, J., Miao, V. P., & VanEtten, H. D. (1996). A gene for maackiain detoxification from a dispensable chromosome of *Nectria haematococca*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 251(4), 397–406.
- de Jonge, R., Peter van Esse, H., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. A. J., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science*, 329(5994), 953–955. <https://doi.org/10.1126/science.1190859>
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., & Farquhar, M. G. (2000). The Regulator of G Protein Signaling Family. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1), 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.235>

- DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B., & Sweigard, J. A. (1999). Magnaporthe grisea pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *The Plant Cell*, 11(10), 2013–2030. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.10.2013>
- Díaz-Hellín, P., Naranjo, V., Úbeda, J., & Briones, A. (2016). Saccharomyces cerevisiae and metabolic activators: HXT3 gene expression and fructose/glucose discrepancy in sluggish fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(12), 196. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2154-9>
- Dilks, T., Halsey, K., De Vos, R. P., Hammond-Kosack, K. E., & Brown, N. A. (2019). Non-canonical fungal G-protein coupled receptors promote Fusarium head blight on wheat. *PLOS Pathogens*, 15(4), e1007666. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007666>
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A. R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., & Kahmann, R. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478(7369), 395–398. <https://doi.org/10.1038/nature10454>
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., & Kahmann, R. (2009). Pep1, a Secreted Effector Protein of Ustilago maydis, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000290>
- Duveiller, E., Singh, R. P., & Nicol, J. M. (2007). The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica*, 157(3), 417–430. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9380-z>
- Emmett, R. W., & Parbery, D. G. (1975). Appressoria. *Annual Review of Phytopathology*, 13(1), 147–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.13.090175.001051>
- Eriksson, K.-E., Pettersson, B., & Westermark, U. (1974). Oxidation: An important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Letters*, 49(2), 282–285. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)80531-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80531-4)

- Feng, B., & Marzluf, G. A. (1998). Interaction between Major Nitrogen Regulatory Protein NIT2 and Pathway-Specific Regulatory Factor NIT4 Is Required for Their Synergistic Activation of Gene Expression in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(7), 3983–3990. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.7.3983>
- Feng, J., Liu, G., Selvaraj, G., Hughes, G. R., & Wei, Y. (2005). A secreted lipase encoded by LIP1 is necessary for efficient use of saturated triglyceride lipids in *Fusarium graminearum*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 12), 3911–3921. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28261-0>
- Frandsen, R. J. N., Nielsen, N. J., Maolanon, N., Sorensen, J. C., Olsson, S., Nielsen, J., & Giese, H. (2006). The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology*, 61(4), 1069–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05295.x>
- Frandsen, R. J. N., Schütt, C., Lund, B. W., Staerk, D., Nielsen, J., Olsson, S., & Giese, H. (2011). Two Novel Classes of Enzymes Are Required for the Biosynthesis of Aurofusarin in *Fusarium graminearum*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10419–10428. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179853>
- Fridovich, I. (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Frommhagen, M., Sforza, S., Westphal, A. H., Visser, J., Hinz, S. W. A., Koetsier, M. J., van Berkel, W. J. H., Gruppen, H., & Kabel, M. A. (2015). Discovery of the combined oxidative cleavage of plant xylan and cellulose by a new fungal polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0284-1>
- Fu, Y. H., & Marzluf, G. A. (1990). nit-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), 5331–5335. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5331>

- Gao, T., Chen, J., & Shi, Z. (2016). *Fusarium graminearum* pyruvate dehydrogenase kinase 1 (FgPDK1) Is Critical for Conidiation, Mycelium Growth, and Pathogenicity. *PLOS ONE*, 11(6), e0158077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158077>
- Gardiner, D. M., Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Novel Genes of *Fusarium graminearum* That Negatively Regulate Deoxynivalenol Production and Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(12), 1588–1600. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1588>
- Ghareeb, H., Zhao, Y., & Schirawski, J. (2019). *Sporisorium reilianum* possesses a pool of effector proteins that modulate virulence on maize: S. reilianum-specific effectors. *Molecular Plant Pathology*, 20(1), 124–136. <https://doi.org/10.1111/mpp.12744>
- Giese, H., Sondergaard, T. E., & Sørensen, J. L. (2013). The AreA transcription factor in *Fusarium graminearum* regulates the use of some nonpreferred nitrogen sources and secondary metabolite production. *Fungal Biology*, 117(11–12), 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.10.006>
- Glaserapp, A. (2017). *Untersuchungen zur frühen Infektion der Weizenblüte durch Fusarium graminearum*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 515–525. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00252.x>
- Grell, M. N., Mouritzen, P., & Giese, H. (2003). A *Blumeria graminis* gene family encoding proteins with a C-terminal variable region with homologues in pathogenic fungi. *Gene*, 311, 181–192. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00610-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00610-3)
- Gu, F., Khimani, A., Rane, S. G., Flurkey, W. H., Bozarth, R. F., & Smith, T. J. (1995). Structure and function of a virally encoded fungal toxin from *Ustilago maydis*: a fungal and mammalian Ca²⁺ channel inhibitor. *Structure*, 3(8), 805–814. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00215-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00215-5)
- Gu, Q., Zhang, C., Liu, X., & Ma, Z. (2015). A transcription factor FgSte12 is required for pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/mpp.12155>

- Göldener, U., Seong, K.-Y., Boddu, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J.-R., Adam, G., Mewes, H.-W., Muehlbauer, G. J., & Kistler, H. C. (2006). Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genetics and Biology*, 43(5), 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.01.005>
- Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., & Nürnberger, T. (2007). Bacteria-derived Peptidoglycans Constitute Pathogen-associated Molecular Patterns Triggering Innate Immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32338–32348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704886200>
- Haack, F. S., Poehlein, A., Kröger, C., Voigt, C. A., Piepenbring, M., Bode, H. B., Daniel, R., Schäfer, W., & Streit, W. R. (2016). Molecular Keys to the Janthinobacterium and Duganella spp. Interaction with the Plant Pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01668>
- Hahn, M. G., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1981). Host-Pathogen Interactions: XIX. The Endogenous Elicitor, A Fragment Of A Plant Cell Wall Polysaccharide That Elicits Phytoalexin Accumulation In Soybeans. *Plant Physiology*, 68(5), 1161–1169. <https://doi.org/10.1104/pp.68.5.1161>
- Hammond-Kosack, K. E., & Rudd, J. J. (2008). Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen. *Plant Signaling & Behavior*, 3(11), 993–995. <https://doi.org/10.4161/psb.6292>
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014>
- Harris, L. J., Balcerzak, M., Johnston, A., Schneiderman, D., & Ouellet, T. (2016). Host-preferential *Fusarium graminearum* gene expression during infection of wheat, barley, and maize. *Fungal Biology*, 120(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.010>

- Hernández-Monjaraz, W. S., Caudillo-Pérez, C., Salazar-Sánchez, P. U., & Macías-Sánchez, K. L. (2018). Influence of iron and copper on the activity of laccases in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.002>
- Hicks, J. K. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Galpha protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal*, 16(16), 4916–4923. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4916>
- Hohn, T. M., Desjardins, A. E., & McCormick, S. P. (1995). The Tri4 gene of *Fusarium sporotrichioides* encodes a cytochrome P450 Monooxygenase involved in trichothecene biosynthesis. *MGG Molecular & General Genetics*, 248(1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/BF02456618>
- Hou, R., Jiang, C., Zheng, Q., Wang, C., & Xu, J.-R. (2015). The AreA transcription factor mediates the regulation of deoxynivalenol (DON) synthesis by ammonium and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signalling in *Fusarium graminearum*: Regulation of DON synthesis by AreA. *Molecular Plant Pathology*, 16(9), 987–999. <https://doi.org/10.1111/mpp.12254>
- Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Kistler, H. C., & Xu, J.-R. (2002). A Mitogen-Activated Protein Kinase Gene (*MGV1*) in *Fusarium graminearum* Is Required for Female Fertility, Heterokaryon Formation, and Plant Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11), 1119–1127. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1119>
- Hu, S., Zhou, X., Gu, X., Cao, S., Wang, C., & Xu, J.-R. (2014). The cAMP-PKA Pathway Regulates Growth, Sexual and Asexual Differentiation, and Pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(6), 557–566. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0306-R>
- Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Zhang, X., & Kang, Z. (2008). Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/BF03356233>

- Huang, W., Hong, S., Tang, G., Lu, Y., & Wang, C. (2019). Unveiling the function and regulation control of the DUF3129 family proteins in fungal infection of hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1767), 20180321. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0321>
- Hunter, R. E. (1974). Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*. *Physiological Plant Pathology*, 4(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(74\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0048-4059(74)90002-2)
- Ilgen, P., Haderer, B., Maier, F. J., & Schäfer, W. (2009). Developing Kernel and Rachis Node Induce the Trichothecene Pathway of *Fusarium graminearum* During Wheat Head Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(8), 899–908. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0899>
- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F. L., Agger, J. W., Kracher, D., Kittl, R., Ludwig, R., Haltrich, D., Eijssink, V. G. H., & Horn, S. J. (2014). A C4-oxidizing Lytic Polysaccharide Monooxygenase Cleaving Both Cellulose and Cello-oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5), 2632–2642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530196>
- Jabs, T., Dietrich, R. A., & Dangl, J. L. (1996). Initiation of Runaway Cell Death in an Arabidopsis Mutant by Extracellular Superoxide. *Science*, 273(5283), 1853–1856. <https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1853>
- Jansen, C., von Wettstein, D., Schafer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16892–16897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508467102>
- Jenczmionka, N. J. (2004). *The role of mitogen-activated protein kinases for developmental and pathogenic processes of Fusarium graminearum, the causal agent of the head blight disease of small grain cereals*. Dissertation, Universität Hamburg.

- Jenczmionka, N. J., Maier, F. J., Lösch, A. P., & Schäfer, W. (2003). Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. *Current Genetics*, 43(2), 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0379-2>
- Jenczmionka, N. J., & Schäfer, W. (2004). The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current Genetics*, 47(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0547-z>
- Jiang, C., Cao, S., Wang, Z., Xu, H., Liang, J., Liu, H., Wang, G., Ding, M., Wang, Q., Gong, C., Feng, C., Hao, C., & Xu, J.-R. (2019). An expanded subfamily of G-protein-coupled receptor genes in *Fusarium graminearum* required for wheat infection. *Nature Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0468-8>
- Jiang, C., Zhang, C., Wu, C., Sun, P., Hou, R., Liu, H., Wang, C., & Xu, J.-R. (2016). *TRI6* and *TRI10* play different roles in the regulation of deoxynivalenol (DON) production by cAMP signalling in *Fusarium graminearum*: cAMP induced DON production. *Environmental Microbiology*, 18(11), 3689–3701. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13279>
- Johnson, D., Krsek, M., Wellington, E. M. H., Stott, A. W., Cole, L., Bardgett, R. D., Read, D. J., & Leake, J. R. (2005). Soil invertebrates disrupt carbon flow through fungal networks. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5737), 1047. <https://doi.org/10.1126/science.1114769>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Justesen, A., Somerville, S., Christiansen, S., & Giese, H. (1996). Isolation and characterization of two novel genes expressed in germinating conidia of the obligate biotroph *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Gene*, 170(1), 131–135. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00875-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00875-6)

- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., ... Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Kays, A. M., & Borkovich, K. A. (2004). Signal Transduction Pathways Mediated by Heterotrimeric G Proteins. In R. Brambl & G. A. Marzluf (Hrsg.), *Biochemistry and Molecular Biology* (S. 175–207). https://doi.org/10.1007/978-3-662-06064-3_10
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Kim, H., & Woloshuk, C. P. (2011). Functional Characterization of *fst1* in *Fusarium verticillioides* During Colonization of Maize Kernels. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(1), 18–24. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-10-0074>
- Kim, J.-E., Han, K.-H., Jin, J., Kim, H., Kim, J.-C., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2005). Putative Polyketide Synthase and Laccase Genes for Biosynthesis of Aurofusarin in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1701–1708. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1701-1708.2005>
- Kim, J.-E., Jin, J., Kim, H., Kim, J.-C., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2006). GIP2, a Putative Transcription Factor That Regulates the Aurofusarin Biosynthetic Gene Cluster in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1645–1652. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1645-1652.2006>
- Kim, Y., Kim, H., Son, H., Choi, G. J., Kim, J.-C., & Lee, Y.-W. (2014). MYT3, A Myb-Like Transcription Factor, Affects Fungal Development and Pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 9(4), e94359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094359>
- King, R., Urban, M., Hammond-Kosack, M. C. U., Hassani-Pak, K., & Hammond-Kosack, K. E. (2015). The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 16(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1756-1>

- Kjaergaard, C. H., Qayyum, M. F., Wong, S. D., Xu, F., Hemsworth, G. R., Walton, D. J., Young, N. A., Davies, G. J., Walton, P. H., Johansen, K. S., Hodgson, K. O., Hedman, B., & Solomon, E. I. (2014). Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), 8797–8802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408115111>
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E. V. L., van der Does, H. C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., & O'Connell, R. J. (2012). Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002643. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002643>
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., Davies, R. W., & Arst, H. N. (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal*, 9(5), 1355–1364.
- Kusch, M. T. (2014). *Identifizierung und Charakterisierung virulenz-spezifischer Gene in Fusarium graminearum*. Masterarbeit, Universität Hamburg.
- Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., & Latge, J.-P. (2010). Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, 75(4), 910–923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x>

- Lê, Q., Gutiérrez-Marcos, J. F., Costa, L. M., Meyer, S., Dickinson, H. G., Lörz, H., Kranz, E., & Scholten, S. (2005). Construction and screening of subtracted cDNA libraries from limited populations of plant cells: a comparative analysis of gene expression between maize egg cells and central cells: Differential and cell type-specific gene expression. *The Plant Journal*, 44(1), 167–178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02518.x>
- Lee, B. N., & Adams, T. H. (1994). Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brlA and premature initiation of development. *Molecular Microbiology*, 14(2), 323–334.
- Lee, T., Han, Y.-K., Kim, K.-H., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2002). Tri13 and Tri7 Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2148–2154. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2148-2154.2002>
- Lee, T., Oh, D.-W., Kim, H.-S., Lee, J., Kim, Y.-H., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2001). Identification of Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae* by Using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2966–2972. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2966-2972.2001>
- Lee, Y. H., & Dean, R. A. (1993). cAMP Regulates Infection Structure Formation in the Plant Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 693–700. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.6.693>
- Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., & Rogalski, J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology*, 41(3–4), 185–227.
- Li, L., Wright, S. J., Krystofova, S., Park, G., & Borkovich, K. A. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 423–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093432>
- Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. *FEMS Microbiology Letters*, 300(2), 201–215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x>

- Lin, Y., Son, H., Lee, J., Min, K., Choi, G. J., Kim, J.-C., & Lee, Y.-W. (2011). A Putative Transcription Factor MYT1 Is Required for Female Fertility in the Ascomycete *Gibberella zeae*. *PLoS ONE*, 6(10), e25586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025586>
- Lin, Y., Son, H., Min, K., Lee, J., Choi, G. J., Kim, J.-C., & Lee, Y.-W. (2012). A Putative Transcription Factor MYT2 Regulates Perithecius Size in the Ascomycete *Gibberella zeae*. *PLoS ONE*, 7(5), e37859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037859>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lu, S., & Edwards, M. C. (2016). Genome-Wide Analysis of Small Secreted Cysteine-Rich Proteins Identifies Candidate Effector Proteins Potentially Involved in *Fusarium graminearum* –Wheat Interactions. *Phytopathology*, 106(2), 166–176. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-0215-R>
- Lunprom, S., Pongcharoen, P., Sekito, T., Kawano-Kawada, M., Kakinuma, Y., & Akiyama, K. (2015). Characterization of vacuolar amino acid transporter from *Fusarium oxysporum* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(12), 1972–1979. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058703>
- Lysøe, E., Seong, K.-Y., & Kistler, H. C. (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(9), 995–1000. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0038>
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., & Fuhrmann, G. F. (2002). Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 539–550. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x>

- Maier, F. J., Miedaner, T., Hadel, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H., & Schäfer, W. (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7(6), 449–461. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00351.x>
- Malonek, S., Rojas, M. C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., & Tudzynski, B. (2004). The NADPH-cytochrome P450 Reductase Gene from *Gibberella fujikuroi* Is Essential for Gibberellin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25075–25084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308517200>
- Malz, S. (2004). *Untersuchungen zur Physiologie des getreidepathogenen Pilzes Fusarium graminearum Schwabe durch gezielte Gendisruption*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Martín, J. F., van den Berg, M. A., Ver Loren van Themaat, E., & Liras, P. (2019). Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: Impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis. *Biotechnology Advances*, S0734975019300734. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.014>
- Martínez-Soto, D., & Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.02.006>
- McCormick, S. P., Alexander, N. J., & Proctor, R. H. (2006). *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(7), 636–642. <https://doi.org/10.1139/w06-011>
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., & Talbot, N. J. (2012). Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease. *The Plant Cell*, 24(1), 322–335. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092957>

- Merhej, J., Richard-Forget, F., & Barreau, C. (2011). The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(3), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.008>
- Messerschmidt, A., & Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin: Modelling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 341–352. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15311.x>
- Michielse, C. B., Pfannmüller, A., Macios, M., Rengers, P., Dzikowska, A., & Tudzynski, B. (2014). The interplay between the GATA transcription factors AreA, the global nitrogen regulator and AreB in *Fusarium fujikuroi*: Interplay between AreA and AreB. *Molecular Microbiology*, 91(3), 472–493. <https://doi.org/10.1111/mmi.12472>
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T.-W. D., & Tudzynski, B. (2003). AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR: *Gibberella fujikuroi* nitrogen metabolite repression. *Molecular Microbiology*, 47(4), 975–991. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03326.x>
- Min, K., Shin, Y., Son, H., Lee, J., Kim, J.-C., Choi, G. J., & Lee, Y.-W. (2012). Functional analyses of the nitrogen regulatory gene *areA* in *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1), 66–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02620.x>
- Misas Villamil, J. C., Mueller, A. N., Demir, F., Meyer, U., Ökmen, B., Schulze Hüynck, J., Breuer, M., Dauben, H., Win, J., Huesgen, P. F., & Doeblemann, G. (2019). A fungal substrate mimicking molecule suppresses plant immunity via an inter-kingdom conserved motif. *Nature Communications*, 10(1), 1576. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09472-8>
- Morais do Amaral, A., Antoniw, J., Rudd, J. J., & Hammond-Kosack, K. E. (2012). Defining the Predicted Protein Secretome of the Fungal Wheat Leaf Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE*, 7(12), e49904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049904>

- Mukherjee, M., Kim, J.-E., Park, Y.-S., Kolomiets, M. V., & Shim, W.-B. (2011). Regulators of G-protein signalling in *Fusarium verticillioides* mediate differential host-pathogen responses on nonviable versus viable maize kernels: RGS in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant Pathology*, 12(5), 479–491. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00686.x>
- Nasmith, C. G., Walkowiak, S., Wang, L., Leung, W. W. Y., Gong, Y., Johnston, A., Harris, L. J., Guttman, D. S., & Subramaniam, R. (2011). Tri6 Is a Global Transcription Regulator in the Phytopathogen *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002266. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002266>
- Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1636–1639. <https://doi.org/10.1126/science.1071550>
- Nguyen, T. V., Schäfer, W., & 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(9), 1142–1156. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0047-R>
- Niu, C., Payne, G. A., & Woloshuk, C. P. (2015). Transcriptome changes in *Fusarium verticillioides* caused by mutation in the transporter-like gene FST1. *BMC Microbiology*, 15(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0427-3>
- Niu, C., Payne, G. A., & Woloshuk, C. P. (2017). Involvement of FST1 from *Fusarium verticillioides* in virulence and transport of inositol: Function of FST1 from *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant Pathology*, 18(5), 695–707. <https://doi.org/10.1111/mpp.12430>
- Nothnagel, E. A., McNeil, M., Albersheim, P., & Dell, A. (1983). Host-Pathogen Interactions: XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiology*, 71(4), 916–926. <https://doi.org/10.1104/pp.71.4.916>
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., Damm, U., Buiate, E. A., Epstein, L., ... Vaillancourt, L. J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9), 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>

- Oide, S., Berthiller, F., Wiesenberger, G., Adam, G., & Turgeon, B. G. (2015). Individual and combined roles of malonichrome, ferricrocin, and TAFC siderophores in *Fusarium graminearum* pathogenic and sexual development. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00759>
- Palmer, D. A., Thompson, J. K., Li, L., Prat, A., & Wang, P. (2006). Gib2, A Novel G β -like/RACK1 Homolog, Functions as a G β Subunit in cAMP Signaling and Is Essential in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32596–32605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602768200>
- Park, A. R., Cho, A.-R., Seo, J.-A., Min, K., Son, H., Lee, J., Choi, G. J., Kim, J.-C., & Lee, Y.-W. (2012). Functional analyses of regulators of G protein signaling in *Gibberella zeae*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(7), 511–520. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.05.006>
- Park, G., Bruno, K. S., Staiger, C. J., Talbot, N. J., & Xu, J.-R. (2004). Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus: MST12 and appressorial penetration. *Molecular Microbiology*, 53(6), 1695–1707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04220.x>
- Park, G., Xue, C., Zheng, L., Lam, S., & Xu, J.-R. (2002). MST12 Regulates Infectious Growth But Not Appressorium Formation in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(3), 183–192. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.183>
- Parnell, S. C., Marotti, L. A., Kiang, L., Torres, M. P., Borchers, C. H., & Dohlman, H. G. (2005). Phosphorylation of the RGS Protein Sst2 by the MAP Kinase Fus3 and Use of Sst2 as a Model To Analyze Determinants of Substrate Sequence Specificity [†]. *Biochemistry*, 44(22), 8159–8166. <https://doi.org/10.1021/bi0503091>
- Pedersen, P. B., & Miller, J. D. (1999). The fungal metabolite culmorin and related compounds. *Natural Toxins*, 7(6), 305–309.
- Pedras, M. S. C., Yaya, E. E., & Glawischnig, E. (2011). The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: Chemistry and biology. *Natural Product Reports*, 28(8), 1381. <https://doi.org/10.1039/c1np00020a>

- Peplow, A. W., Tag, A. G., Garifullina, G. F., & Beremand, M. N. (2003). Identification of New Genes Positively Regulated by Tri10 and a Regulatory Network for Trichothecene Mycotoxin Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2731–2736. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2731-2736.2003>
- Pestka, J. J., & Dong, W. (1994). Progressive serum IgE elevation in the B6C3F1 mouse following withdrawal of dietary vomitoxin (deoxynivalenol). *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, 22(2), 314–316.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & 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(9), e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pfannmüller, A., Wagner, D., Sieber, C., Schöning, B., Boeckstaens, M., Marini, A. M., & Tudzynski, B. (2015). The General Amino Acid Permease FfGap1 of *Fusarium fujikuroi* Is Sorted to the Vacuole in a Nitrogen-Dependent, but Npr1 Kinase-Independent Manner. *PLOS ONE*, 10(4), e0125487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125487>
- Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Dorsselaer, A. V., & Jeltsch, J.-M. (2005). Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. *Current Genetics*, 48(6), 366–379. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0040-3>
- Phillips, C. M., Beeson, W. T., Cate, J. H., & Marletta, M. A. (2011). Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*, 6(12), 1399–1406. <https://doi.org/10.1021/cb200351y>
- Pigné, S., Zykwinska, A., Janod, E., Cuenot, S., Kerkoud, M., Raulo, R., Bataillé-Simoneau, N., Marchi, M., Kwasiborski, A., N’Guyen, G., Mabilieu, G., Simoneau, P., & Guillemette, T. (2017). A flavoprotein supports cell wall properties in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0029-3>

- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. *Current Genomics*, 12(2), 104–112. <https://doi.org/10.2174/138920211795564331>
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F., & Ouellet, T. (2007). Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with *Tri* genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*, 581(3), 443–447. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.003>
- Prelusky, D. B., Gerdes, R. G., Underhill, K. L., Rotter, B. A., Jui, P. Y., & Trenholm, H. L. (1994). Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig. *Natural Toxins*, 2(3), 97–104.
- Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A., & 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(2), 159–169. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.159>
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., & McCormick, S. P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 8(4), 593–601.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P., & Desjardins, A. E. (1995). Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1923–1930. <https://doi.org/10.1128/aem.61.5.1923-1930.1995>
- Punt, P. J., Dingemanse, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D. M., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90142-E](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90142-E)

- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.-C. N., Johansen, K. S., Krogh, K. B. R. M., Jorgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., Tryfona, T., Walter, C. P., Dupree, P., Xu, F., Davies, G. J., & Walton, P. H. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15079–15084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Küfner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A., Luberaeki, B., Seitz, H. U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M., & Nürnberger, T. (2006). Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *The Plant Cell*, 18(12), 3721–3744. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044180>
- Rand, K. N., & Arst, H. N. (1978). Mutations in nirA gene of *Aspergillus nidulans* and nitrogen metabolism. *Nature*, 272(5655), 732–734. <https://doi.org/10.1038/272732a0>
- Reiter, W.-D. (1998). The molecular analysis of cell wall components. *Trends in Plant Science*, 3(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01169-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01169-2)
- Rep, M., Van Der Does, H. C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., De Koster, C. G., & Cornelissen, B. J. C. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato: Cysteine-rich protein required for I-3-mediated resistance. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1373–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x>
- Ross, E. M., & Wilkie, T. M. (2000). GTPase-Activating Proteins for Heterotrimeric G Proteins: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 795–827. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.795>

- Salomon, S., Gácsér, A., Frerichmann, S., Kröger, C., Schäfer, W., & Voigt, C. A. (2012). The secreted lipase FGL1 is sufficient to restore the initial infection step to the apathogenic *Fusarium graminearum* MAP kinase disruption mutant Δ gpmk1. *European Journal of Plant Pathology*, 134(1), 23–37. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0017-2>
- Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F. L., Kaaij, R. M. van der, & Kan, J. A. L. van. (2002). Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology*, 43(4), 883–894. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02801.x>
- Seong, K.-Y., Pasquali, M., Zhou, X., Song, J., Hilburn, K., McCormick, S., Dong, Y., Xu, J.-R., & Kistler, H. C. (2009). Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors *Tri6* and *Tri10* reveals adaptations for toxin biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 72(2), 354–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06649.x>
- Shimada, C., Lipka, V., O'Connell, R., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., & Takano, Y. (2006). Nonhost Resistance in *Arabidopsis-Colletotrichum* Interactions Acts at the Cell Periphery and Requires Actin Filament Function. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 270–279. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0270>
- Shimizu, K., & Keller, N. P. (2001). Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 157(2), 591–600.
- Sieber, C. M. K., Lee, W., Wong, P., Münsterkötter, M., Mewes, H.-W., Schmeitzl, C., Varga, E., Berthiller, F., Adam, G., & Güldener, U. (2014). The *Fusarium graminearum* Genome Reveals More Secondary Metabolite Gene Clusters and Hints of Horizontal Gene Transfer. *PLoS ONE*, 9(10), e110311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110311>
- Smith, C. J. (1996). Tansley Review No. 86 Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist*, 132(1), 1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04506.x>

- Smoliga, J. M., Baur, J. A., & Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(8), 1129–1141. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100143>
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563–2606. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- Solomon, E. I., Szilagyi, R. K., DeBeer George, S., & Basumallick, L. (2004). Electronic Structures of Metal Sites in Proteins and Models: Contributions to Function in Blue Copper Proteins. *Chemical Reviews*, 104(2), 419–458. <https://doi.org/10.1021/cr0206317>
- Son, H., Kim, M.-G., Min, K., Seo, Y.-S., Lim, J. Y., Choi, G. J., Kim, J.-C., Chae, S.-K., & Lee, Y.-W. (2013). AbaA Regulates Conidiogenesis in the Ascomycete Fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 8(9), e72915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072915>
- Son, H., Seo, Y.-S., Min, K., Park, A. R., Lee, J., Jin, J.-M., Lin, Y., Cao, P., Hong, S.-Y., Kim, E.-K., Lee, S.-H., Cho, A., Lee, S., Kim, M.-G., Kim, Y., Kim, J.-E., Kim, J.-C., Choi, G. J., Yun, S.-H., Lim, J. Y., Kim, M., Lee, Y.-H., Choi, Y.-D., & Lee, Y.-W. (2011). A Phenome-Based Functional Analysis of Transcription Factors in the Cereal Head Blight Fungus, *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002310. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002310>
- Song, Y. C., Li, H., Ye, Y. H., Shan, C. Y., Yang, Y. M., & Tan, R. X. (2004). Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.005>
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Taylor, J. M., Hane, J. K., Singh, K. B., & Manners, J. M. (2013). A comparative hidden Markov model analysis pipeline identifies proteins characteristic of cereal-infecting fungi. *BMC Genomics*, 14(1), 807. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-807>

- Stappler, E., Dattenböck, C., Tisch, D., & Schmoll, M. (2017). Analysis of Light- and Carbon-Specific Transcriptomes Implicates a Class of G-Protein-Coupled Receptors in Cellulose Sensing. *MSphere*, 2(3), e00089-17, /msph/2/3/e00089-17.atom. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00089-17>
- Stephens, A. E., Gardiner, D. M., White, R. G., Munn, A. L., & Manners, J. M. (2008). Phases of Infection and Gene Expression of *Fusarium graminearum* During Crown Rot Disease of Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1571–1581. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1571>
- Tag, A. G., Garifullina, G. F., Peplow, A. W., Ake, C., Phillips, T. D., Hohn, T. M., & Beremand, M. N. (2001). A Novel Regulatory Gene, Tri10, Controls Trichothecene Toxin Production and Gene Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5294–5302. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5294-5302.2001>
- Takahara, H., Hacquard, S., Kombrink, A., Hughes, H. B., Halder, V., Robin, G. P., Hiruma, K., Neumann, U., Shinya, T., Kombrink, E., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J., & O'Connell, R. J. (2016). *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity. *New Phytologist*, 211(4), 1323–1337. <https://doi.org/10.1111/nph.13994>
- Tan, K.-C., Oliver, R. P., Solomon, P. S., & Moffat, C. S. (2010). Proteinaceous necrotrophic effectors in fungal virulence. *Functional Plant Biology*, 37(10), 907. <https://doi.org/10.1071/FP10067>
- Tan, T.-C., Kracher, D., Gandini, R., Sygmond, C., Kittl, R., Haltrich, D., Hällberg, B. M., Ludwig, R., & Divne, C. (2015). Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. *Nature Communications*, 6(1), 7542. <https://doi.org/10.1038/ncomms8542>
- Teichert, S., Rutherford, J. C., Wottawa, M., Heitman, J., & Tudzynski, B. (2008). Impact of Ammonium Permeases MepA, MepB, and MepC on Nitrogen-Regulated Secondary Metabolism in *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 187–201. <https://doi.org/10.1128/EC.00351-07>

- Tobiasen, C., Aahman, J., Ravnholt, K. S., Bjerrum, M. J., Grell, M. N., & Giese, H. (2006). Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. *Current Genetics*, 51(1), 43–58. <https://doi.org/10.1007/s00294-006-0103-0>
- Tollervey, D. W., & Arst, H. N. (1981). Mutations to constitutivity and derepression are separate and separable in a regulatory gene of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, 4(1), 63–68. <https://doi.org/10.1007/BF00376787>
- Trapnell, C., Pachter, L., & Salzberg, S. L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), 1105–1111. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>
- Trzaskowski, B., Latek, D., Yuan, S., Ghoshdastider, U., Debinski, A., & Filipek, S. (2012). Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Current Medicinal Chemistry*, 19(8), 1090–1109. <https://doi.org/10.2174/092986712799320556>
- Turner, G. E., & Borkovich, K. A. (1993). Identification of a G protein alpha subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the Gi family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20), 14805–14811.

- Urban, M., Mott, E., Farley, T., & Hammond-Kosack, K. (2003). The *Fusarium graminearum* MAP1 gene is essential for pathogenicity and development of perithecia. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 347–359. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00183.x>
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sørli, M., & Eijsink, V. G. H. (2010). An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science*, 330(6001), 219–222. <https://doi.org/10.1126/science.1192231>
- Villafana, R., Ramdass, A., & Rampersad, S. (2019). Selection of *Fusarium* Trichothecene Toxin Genes for Molecular Detection Depends on TRI Gene Cluster Organization and Gene Function. *Toxins*, 11(1), 36. <https://doi.org/10.3390/toxins11010036>
- Voigt, C. A., Schäfer, W., & Salomon, S. (2005). A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals: Lipase as a virulence factor. *The Plant Journal*, 42(3), 364–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02377.x>
- Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Vu, V. V., Beeson, W. T., Span, E. A., Farquhar, E. R., & Marletta, M. A. (2014). A family of starch-active polysaccharide monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), 13822–13827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408090111>
- Weber, J., Vaclavikova, M., Wiesenberger, G., Haider, M., Hametner, C., Fröhlich, J., Berthiller, F., Adam, G., Mikula, H., & Fruhmann, P. (2018). Chemical synthesis of culmorin metabolites and their biologic role in culmorin and acetyl-culmorin treated wheat cells. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 16(12), 2043–2048. <https://doi.org/10.1039/C7OB02460F>
- Wei, Q., Du, Y., Jin, K., & Xia, Y. (2017). The Ste12-like transcription factor MaSte12 is involved in pathogenicity by regulating the appressorium formation in the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(23–24), 8571–8584. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8569-x>

- Winston, F., Dollard, C., & Ricupero-Hovasse, S. L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, *11*(1), 53–55. <https://doi.org/10.1002/yea.320110107>
- Xu, Y., Vinas, M., Alsarrag, A., Su, L., Pfohl, K., Rohlf, M., Schäfer, W., Chen, W., & Karlovsky, P. (2019). Bis-naphthopyrone pigments protect filamentous ascomycetes from a wide range of predators. *Nature Communications*, *10*(1), 3579. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11377-5>
- Xue, C., Park, G., Choi, W., Zheng, L., Dean, R. A., & Xu, J.-R. (2002). Two Novel Fungal Virulence Genes Specifically Expressed in Appressoria of the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell*, *14*(9), 2107–2119. <https://doi.org/10.1105/tpc.003426>
- Yao, S.-H., Guo, Y., Wang, Y.-Z., Zhang, D., Xu, L., & Tang, W.-H. (2016). A cytoplasmic Cu-Zn superoxide dismutase SOD1 contributes to hyphal growth and virulence of *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, *91*, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.03.006>
- Yu, H.-Y., Seo, J.-A., Kim, J.-E., Han, K.-H., Shim, W.-B., Yun, S.-H., & Lee, Y.-W. (2008). Functional analyses of heterotrimeric G protein G and G subunits in *Gibberella zeae*. *Microbiology*, *154*(2), 392–401. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012260-0>
- Yu, J. H., Wieser, J., & Adams, T. H. (1996). The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *The EMBO Journal*, *15*(19), 5184–5190. Abgerufen von PubMed. (8895563)
- Yu, J.-H. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, *44*(2), 145–154.
- Zhang, H., Tang, W., Liu, K., Huang, Q., Zhang, X., Yan, X., Chen, Y., Wang, J., Qi, Z., Wang, Z., Zheng, X., Wang, P., & Zhang, Z. (2011). Eight RGS and RGS-like Proteins Orchestrate Growth, Differentiation, and Pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, *7*(12), e1002450. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002450>

- Zhang, X.-W., Jia, L.-J., Zhang, Y., Jiang, G., Li, X., Zhang, D., & Tang, W.-H. (2012). In Planta Stage-Specific Fungal Gene Profiling Elucidates the Molecular Strategies of *Fusarium graminearum* Growing inside Wheat Coleoptiles. *The Plant Cell*, 24(12), 5159–5176. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105957>
- Zhang, Y., He, J., Jia, L.-J., Yuan, T.-L., Zhang, D., Guo, Y., Wang, Y., & Tang, W.-H. (2016). Cellular Tracking and Gene Profiling of *Fusarium graminearum* during Maize Stalk Rot Disease Development Elucidates Its Strategies in Confronting Phosphorus Limitation in the Host Apoplast. *PLoS Pathogens*, 12(3), e1005485. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005485>
- Zhao, X., Mehrabi, R., & Xu, J.-R. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 6(10), 1701–1714. <https://doi.org/10.1128/EC.00216-07>
- Zheng, D., Zhang, S., Zhou, X., Wang, C., Xiang, P., Zheng, Q., & Xu, J.-R. (2012). The FgHOG1 Pathway Regulates Hyphal Growth, Stress Responses, and Plant Infection in *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 7(11), e49495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049495>
- Zhu, X., & Williamson, P. (2004). Role of laccase in the biology and virulence of. *FEMS Yeast Research*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.04.004>

6. Abkürzungsverzeichnis

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AUR	Aurofusarin
<i>B. graminis</i>	<i>Blumeria graminis</i>
Bez.	Bezeichnung
bp	Basenpaare
<i>C. higginsianum</i>	<i>Colletotrichum higginsianum</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAZy	kohlenhydrataktive Enzyme
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	Cyanine-based Fluorescent dye
CM	Complete Medium
CS	klassische Sekretion
Ct	Cycle Threshold
CT	klassische Sekretion mit Transmembrandomäne
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DEG	differenziell regulierte Gene
dG	Δ Gpmk1
DH	Dehydrogenase
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DON	Deoxynivalenol
down	herunterreguliert
dpi	Days post inoculation, Tage nach der Inokulation
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii / und andere
<i>F. fujikuroi</i>	<i>Fusarium fujikuroi</i>
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>

<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
FC	Fold Change
FHB	Fusarium Head Blight
FPKM	Fragments Per Kilobase of exons per Million fragments mapped
FS	Fuß-Struktur
GA	gelapptes Appressorium
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GDP	Guanosindiphosphat
ggb.	gegenüber
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
G α , G β , G γ	Untereinheiten des G-Proteins
HM	Histon-modifizierendes Protein
HR	hypersensitive Reaktion
HYG	Hygromycin
IC	Infektionskissen
ID	Identifikator
int.	intern
kb	Kilobasenpaar
KO	Knock out
L.	Linné
LAS	Luminescent Image Analyser
LB	Lysogeny broth
LCM	Laser Capture Mikrodissektion
LD-PCR	Long distance-PCR
LF	linke Flanke
LPMO	lytische Polysaccharid-Monooxygenase
M	Mutante
<i>M. acridum</i>	<i>Metarhizium acridum</i>
<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
<i>M. robersii</i>	<i>Metarhizium robersii</i>
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MIP	Maximumintensitätsprojektion
MO	Monooxygenase
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug-Resistance-Related Protein
MY	Myzel
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NAT	Nourseothricin
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NIV	Nivalenol
no	Gene ohne Annotation
non	nicht differenziell reguliert
non SP	nicht-sekretierte Proteine
NPR	nicht pflanzen-reguliert
NS	nicht-klassische Sekretion
nt	Nukleotid
OE	Overexpression
ORF	Open Reading Frame
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCD	programmierter Zelltod
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	putatives Effektorprotein
PEG	Polyethylenglycol
Pfl.-Reg.	Pflanzen-Regulation
PI	Pflanzen-induziert
PK	Proteinkinase/-phosphatase
PM	Plasmamembran
PR	Pflanzen-reprimiert
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
RAY	Ribosomal-associated protein of yeast
Rep.	Replikat
RES	Resistenzkassette
REST	Relative Expression Software Tool
RF	rechte Flanke
RGS	Regulatoren des G-Protein Signalwegs
RH	Laufhyphen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per Minute

RRE	ROS Related Enzymes
rSAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Standard Minimum
SMART-PCR	Switching Mechanism at 5' end of the RNA Transcript Polymerase Chain Reaction
SMC	Gene aus Clustern der Synthese von Sekundärmetaboliten
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
SOD	Superoxid-Dismutase
SP	sekretierte Proteine
spp.	Spezies
SSC	Saline Sodium Citrate
STC	Sorbitol, Tris-HCl, CaCl ₂
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
T _A	Anlagerungszeit
TAE	Tris, Acetate, EDTA
TB	Terrific broth
TF	Transkriptionsfaktor
TP	Transporterprotein
TRI	Trichothecen
U	Unit
<i>U. hordei</i>	<i>Ustilago hordei</i>
<i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
UK	United Kingdom
up	hochreguliert
USA	United States of America
UV	ultraviolett
v/v	Volume per Volume
vs.	versus
w/v	Weight per Volume
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wildtyp
YPG	Yeast Peptone Dextrose
ZEA	Zearalenon

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklungsformen des <i>F. graminearum</i> Wildtyps 8/1.....	2
Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Infektionsstrukturen von <i>F. graminearum</i> auf Weizen.....	3
Abb. 3: Zyklus der G-Protein-Aktivierung.....	6
Abb. 4: Vergleich des Wildtyps 8/1 (WT 8/1) und der Deletionsmutante der Gpmk1 (Δ Gpmk1) von <i>F. graminearum</i>	9
Abb. 5: Homologe Rekombination durch Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	20
Abb. 6: Konstruktionsstrategie der Δ Gpmk1-Mutante.....	37
Abb. 7: Analyse der Δ Gpmk1-Mutante	38
Abb. 8: Infektionsanalyse der Δ Gpmk1-Mutante	39
Abb. 9: Long-Distance PCR zur Ermittlung des finalen Amplifikationszyklus zur Erstellung der ds cDNA Banken des Wildtyps 8/1	41
Abb. 10: Long-Distance PCR zur Ermittlung des finalen Amplifikationszyklus zur Erstellung der ds cDNA Banken Δ Gpmk1-Mutante	41
Abb. 11: Finalisierte gereinigte ds cDNA Banken des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1-Mutante.....	42
Abb. 12: Grundsätzliche Transkription der Gene von <i>F. graminearum</i> in den drei Zelltypen.....	45
Abb. 13: Transkription der Gene von <i>F. graminearum</i> im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1	46
Abb. 14: Transkriptionsmuster pflanzen-reprimierter Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	52
Abb. 15: Transkriptionsmuster pflanzen-induzierter Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	53
Abb. 16: Transkriptionsmuster differentiell exprimierter Gene in Infektionskissen und Laufhyphen des Wildtyps 8/1	55
Abb. 17: Transkriptionsmuster differentiell exprimierter Gene in Infektionskissen und Laufhyphen der Δ Gpmk1 ..	56
Abb. 18: Transkriptionsmuster des Genoms von Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	57
Abb. 19: Transkriptionsmuster differentiell im Myzel des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 exprimierter Gene.....	60
Abb. 20: Transkriptionsmuster differentiell in den Laufhyphen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 exprimierter Gene.....	61
Abb. 21: Transkriptionsmuster differentiell in den Infektionskissen des Wildtyps 8/1 und der Δ Gpmk1 exprimierter Gene.....	63
Abb. 22: Transkriptionsmuster der Gene nicht-sekretierter Proteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	64
Abb. 23: Transkriptionsmuster der Gene sekretierter Proteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	65
Abb. 24: Transkriptionsmuster der Gene für Transkriptionsfaktoren in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	67
Abb. 25: Transkriptionsmuster der Gene für Transporterproteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	68
Abb. 26: Transkriptionsmuster der Gene für Histon-modifizierende Proteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	69
Abb. 27: Transkriptionsmuster der Gene für Proteinkinasen/-phosphatasen in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	70
Abb. 28: Transkriptionsmuster der Gene für Dehydrogenasen in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	71
Abb. 29: Transkriptionsmuster der Gene für kohlenhydrataktive Enzyme in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	73
Abb. 30: Transkriptionsmuster der Gene für putative Effektorproteine in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	74
Abb. 31: Transkriptionsmuster der Gene für Proteine in Verbindung zu reaktiven Sauerstoffspezies in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	75
Abb. 32: Transkriptionsmuster der Gene für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1	76
Abb. 33: Transkriptionsmuster der Gene in Sekundärmetabolit-Clustern in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	78
Abb. 34: Konstruktion und Analyse der Δ_{WT} FGSG_00006-Mutante	83
Abb. 35: Infektionsstudie auf Weizen mit der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006.....	85
Abb. 36: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Amaretto' mit der Deletionsmutante Δ_{WT} FGSG_00006.....	86
Abb. 37: Asexuelle Reproduktion der Δ_{WT} FGSG_00006 in flüssigem Weizenmedium	86

Abb. 38: Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen	88
Abb. 39: Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen	88
Abb. 40: Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.....	89
Abb. 41: Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.....	89
Abb. 42: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beim Wachstum der Δ_{WT} FGSG_00006 mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT).....	90
Abb. 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch den Wildtyp 8/1 (7 dpi) 92	
Abb. 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch die Δ_{WT} FGSG_00006 (7 dpi)	93
Abb. 45: Transkriptionsprofil des Gens FGSG_00006 in verschiedenen Mutanten in Relation zum Wildtyp 8/1... 95	
Abb. 46: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE _{WT} FGSG_00006	96
Abb. 47: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Nandu' mit der Überexpressionsmutante OE _{WT} FGSG_0000696	
Abb. 48: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE _{ΔG} FGSG_00006	97
Abb. 49: Asexuelle Reproduktion der Überexpressionsmutanten OE _{WT} FGSG_00006 und OE _{ΔG} FGSG_00006 in flüssigem Weizenmedium.....	98
Abb. 50: Wachstum der OE _{WT} FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen	99
Abb. 51: Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen.....	100
Abb. 52: Wachstum der Mutanten OE _{WT} FGSG_00006 und OE _{ΔG} FGSG_00006 unter hyperosmotischen Bedingungen	100
Abb. 53: Wachstum der OE _{WT} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.....	101
Abb. 54: Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid	101
Abb. 55: Wachstum der Mutanten OE _{WT} FGSG_00006 und OE _{ΔG} FGSG_00006 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.....	102
Abb. 56: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beim Wachstum der OE _{WT} FGSG_00006 und OE _{ΔG} FGSG_00006 mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT).....	103
Abb. 57: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch den Wildtyp 8/1 (7 dpi)	105
Abb. 58: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch die OE _{WT} FGSG_00006 (7 dpi)	106
Abb. 59: Transkriptionsprofil der Gene FGSG_03538 (TRI10) und FGSG_16251 (TRI6) in verschiedenen Mutanten in Relation zum Wildtyp 8/1	108
Abb. 60: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE _{ΔG} FGSG_03538 (TRI10)	109
Abb. 61: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE _{ΔG} FGSG_16251 (TRI6)	110
Abb. 62: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Nandu' mit der Überexpressionsmutante OE _{ΔG} FGSG_16251 (TRI6)	110
Abb. 63: Asexuelle Reproduktion der Überexpressionsmutanten OE _{ΔG} FGSG_03538 (TRI10) und OE _{ΔG} FGSG_16251 (TRI6) in flüssigem Weizenmedium	111
Abb. 64: Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_03538 unter hyperosmotischen Bedingungen	113
Abb. 65: Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_16251 unter hyperosmotischen Bedingungen.....	114
Abb. 66: Wachstum der Mutanten OE _{ΔG} FGSG_03538 (TRI10) und OE _{ΔG} FGSG_16251 (TRI6) unter hyperosmotischen Bedingungen	115
Abb. 67: Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_03538 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.....	115
Abb. 68: Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_16251 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid	116
Abb. 69: Wachstum der Mutanten OE _{ΔG} FGSG_03538 (TRI10) und OE _{ΔG} FGSG_16251 (TRI6) unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.....	116
Abb. 70: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beim Wachstum der OE _{ΔG} FGSG_03538 und OE _{ΔG} FGSG_16251 mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT).....	117

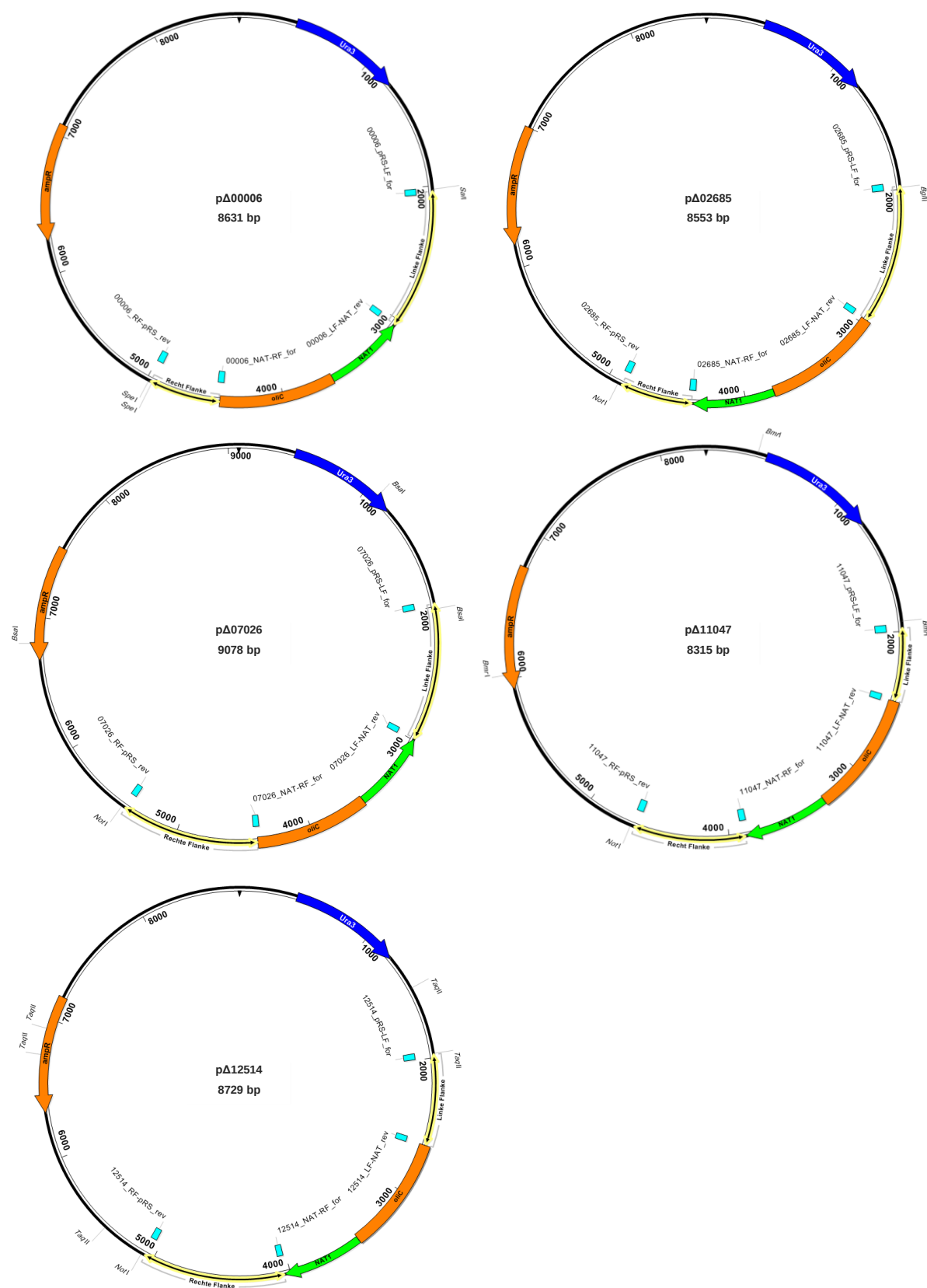
Abb. 71: Anreicherung von Deoxynivalenol (DON) im Pflanzengewebe während der Infektion von Weizen	119
Abb. 72: Vergleich der Transkription des TRI-Clusters zwischen axenischem Myzel und während der frühen Infektion von Weizen	120
Abb. 73: Transkriptionsprofil des TRI-Clusters in Myzel und während der frühen Infektion von Weizen	125
Abb. 74: PCR zur Analyse der Effektor-Deletionsmutanten Δ_{WT} FGSG_02685, Δ_{WT} FGSG_07026, Δ_{WT} FGSG_11047 und Δ_{WT} FGSG_12514	127
Abb. 75: Infektionsstudie auf Weizen mit den Effektor-Deletionsmutanten	128
Abb. 76: Transkriptionsprofil der Gene FGSG_03597 und FGSG_16620 in verschiedenen Mutanten in Relation zum Wildtyp 8/1	130
Abb. 77: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE _{WT} FGSG_03597	132
Abb. 78: Infektionsstudie auf dem Weizenkultivar 'Amaretto' mit der Überexpressionsmutante OE _{WT} FGSG_03597	133
Abb. 79: Infektionsstudie auf Weizen mit der Überexpressionsmutante OE _{WT} FGSG_16620	133
Abb. 80: Asexuelle Reproduktion der Überexpressionsmutanten OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620 in flüssigem Weizenmedium	134
Abb. 81: Wachstum der OE _{WT} FGSG_03597 unter hyperosmotischen Bedingungen	136
Abb. 82: Wachstum der OE _{WT} FGSG_16620 unter hyperosmotischen Bedingungen	137
Abb. 83: Wachstum der Mutanten OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620 unter hyperosmotischen Bedingungen	137
Abb. 84: Wachstum der OE _{WT} FGSG_03597 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid	138
Abb. 85: Wachstum der OE _{WT} FGSG_16620 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid	138
Abb. 86: Wachstum der Mutanten OE _{WT} FGSG_03597 und OE _{WT} FGSG_16620 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid	139
Abb. 87: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	140
Abb. 88: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch den Wildtyp 8/1 (7 dpi)	142
Abb. 89: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Infektion von Weizenpaleae durch die OE _{WT} FGSG_03597 (7 dpi)	143
 Anhang A: Vektorkarten der zur Erstellung der Deletionsmutanten verwendeten Vektoren.	XIX
Anhang B: Vektorkarten der zur Erstellung der Überexpressionsmutanten verwendeten Vektoren.	XX

8. Tabellenverzeichnis

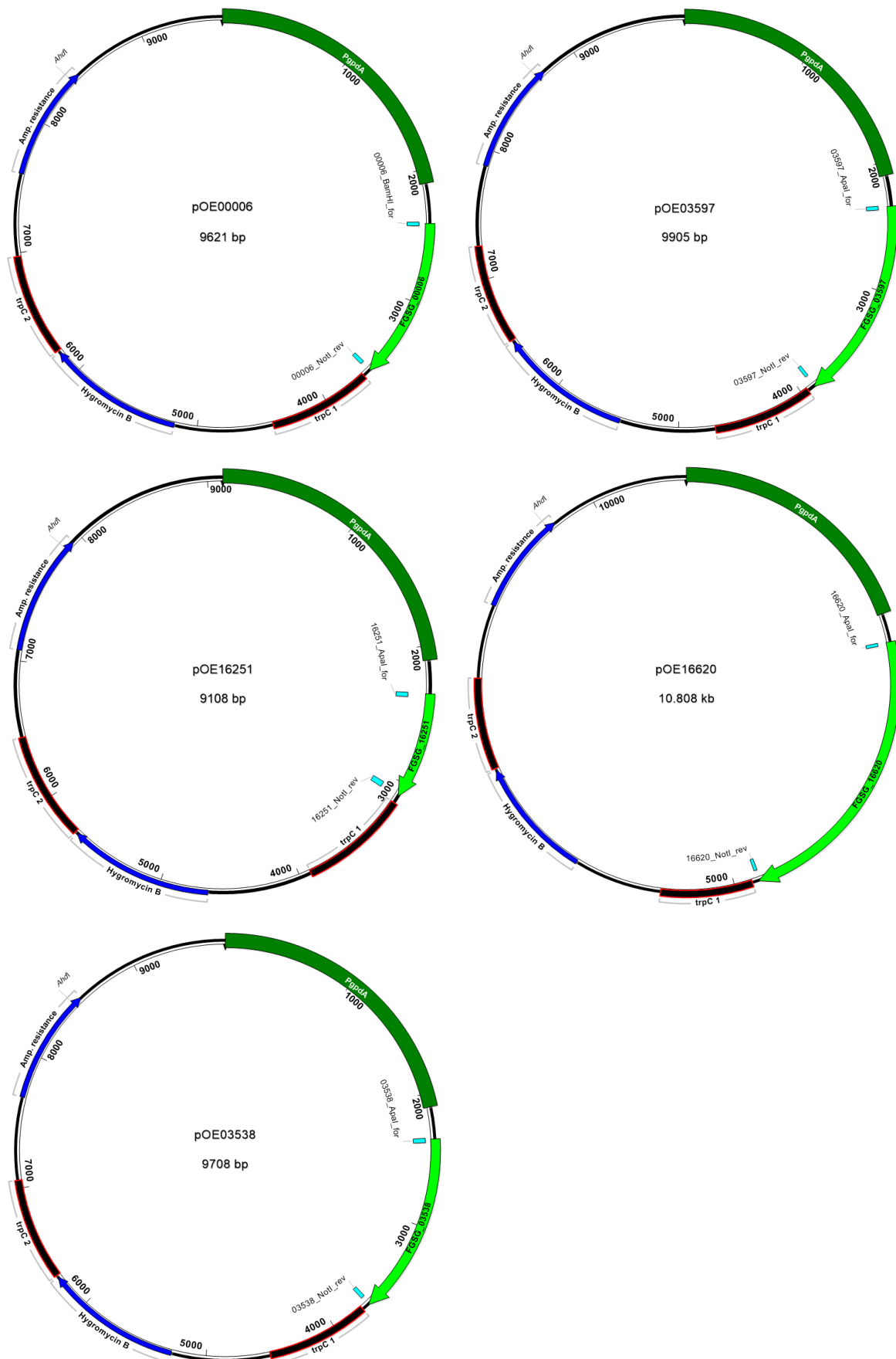
Tab. 1: Oligonukleotide zur Erstellung der Deletionsmutanten.	11
Tab. 2: Oligonukleotide zur Charakterisierung der Deletionsmutanten.	12
Tab. 3: Oligonukleotide zur Erstellung der Überexpressionsvektoren.	12
Tab. 4: Oligonukleotide zur Charakterisierung der Überexpressionsmutanten.	12
Tab. 5: Oligonukleotide zur Erstellung des Transkriptionsprofils der Gene des Sekundärmetabolit-Clusters der Deoxynivalenol-Synthese.	13
Tab. 6: Anzahl der Elemente und Zellfläche der mittels Laser Capture Mikrodissektion gesammelten Ausgangsproben	40
Tab. 7: Qualitätsübersicht der bei der Sequenzierung erfassten DNA-Abschnitte.....	43
Tab. 8: Rangkorrelationsanalyse nach Spearman der sequenzierten ds cDNA-Banken.....	44
Tab. 9: Übersicht über pflanzen-regulierte Gene in Wildtyp 8/1 und Δ Gpmk1.....	48
Tab. 10: Funktionale Aufstellung der pflanzen-regulierten Gene im Wildtyp 8/1	49
Tab. 11: Funktionale Aufstellung der pflanzen-regulierten Gene in der Δ Gpmk1	51
Tab. 12: Funktionale Aufstellung differentiell regulierter Gene im Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1	59
Tab. 13: Expressionsprofil des Trichothecen-Sekundärmetabolit-Clusters in Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1	79
Tab. 14: Expressionsprofil ausgewählter Kandidatengene zur weiterführenden Charakterisierung in Wildtyp 8/1 und der Δ Gpmk1	81

9. Anhang

Anhang 1: Vektorkarten



Anhang A: Vektorkarten der zur Erstellung der Deletionsmutanten verwendeten Vektoren.



Anhang B: Vektorkarten der zur Erstellung der Überexpressionsmutanten verwendeten Vektoren.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und den wissenschaftlichen Beistand in den vergangenen Jahren bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jörg Bormann und Dr. Ana Lilia Martínez-Rocha für die ständige Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und viele Dinge intensiv zu diskutieren.

Dr. Ulrich Güldener und Dr. Martin Münsterkötter danke ich ebenfalls in höchstem Maß. Durch ihre fachliche Kompetenz und Einsatzbereitschaft haben sie diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht.

Des Weiteren möchte ich Birgit Haderl und Cathrin Kröger für ihre Hilfe bei technischen Fragen danken. Für die Durchführung der Transformation von *F. graminearum* gebührt beiden mein zusätzlicher Dank. Auch Iris Fuhrmann gilt Dank für die Unterstützung meiner Arbeit durch ihre Ergebnisse.

Der gesamten Arbeitsgruppe der Molekularen Phytopathologie danke ich für die angenehme Zeit und die vielen Besonderheiten dieser Menschen. Gerade dass wir alle so verschieden sind und trotzdem zu einer Gemeinschaft geworden sind, war immer wieder ein Lichtblick. Besonders möchte ich mich zusätzlich bei meinen Sitznachbarn Anika Glasenapp und Gunnar Baermann für die unzähligen gemeinsamen Stunden im Büro bedanken, die immer wieder ein Grund waren sich irgendwie auf den nächsten Arbeitstag zu freuen. Auch wenn der Weg immer etwas weiter war, danke ich Tobias Hanak von der anderen Seite des Labors für sein offenes Ohr, die ständige Hilfsbereitschaft und alles Weitere, was wir so angestellt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich auch bei meiner Familie und insbesondere meiner Frau Christine für die durchgehende Unterstützung und den Zuspruch in den letzten Jahren bedanken. Mit dem Abschluss dieses Kapitels wird sich vieles ändern und ich bin verdammt froh, dass ich es mit euch zusammen erleben werde.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

(Ort, Datum)

(Michael Mentges)