

**Funktionelle Charakterisierung von Pep1,  
einem sekretierten Effektorprotein von *Ustilago maydis***



**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Christian Herrberger**  
aus Guben

Marburg/Lahn, 2012



**Funktionelle Charakterisierung von Pep1,  
einem sekretierten Effektorprotein von *Ustilago maydis***

**Dissertation**

**zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Christian Herrberger**  
aus Guben

Marburg/Lahn, Juni 2012



Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von August 2008 bis Februar 2012 unter Betreuung von Dr. Gunther Döhlemann in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

Vom Fachbereich  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: \_\_\_\_\_

Erstgutachter: Dr. Gunther Döhlemann  
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2012

Teile dieser Arbeit werden in dem folgenden Artikel veröffentlicht:

Hemmetsberger, C.<sup>1</sup>, **Herrberger, C.**<sup>1</sup>, Döhlemann, G., Hilmer, M.: The *Ustilago* effector Pep1 and its role in biotrophy of smut fungi. (Publikation eingereicht)  
(<sup>1</sup> **gleichberechtigte Erstautorenschaft**)

Weitere Veröffentlichungen:

Herre, S., Schadendorf, T., Ivanov, I., **Herrberger, C.**, Steinle, W., Rück-Braun, K., Preissner, R., Kühn, H.: Photoactivation of an Inhibitor of the 12/15-Lipoxygenase Pathway, *ChemBioChem* 2006, 7: 1089-95

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung von Pep1, einem sekretierten Effektorprotein von *Ustilago maydis*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, März 2012

---

Christian Herrberger

## Zusammenfassung

*Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrandes, benötigt zur Etablierung einer biotrophen Interaktion mit seiner Wirtspflanze Mais eine Vielzahl sekretierter Effektoren. Die Deletion des für den Effektor Pep1 kodierenden Gens *um01987* führt zum vollständigen Pathogenitätsverlust. Die Pflanze reagiert auf Penetrationsversuche der  $\Delta pep1$ -Mutante mit der Induktion verschiedener Abwehrreaktionen, was sich z.B. durch die Bildung nekrotischer Läsionen sowie reaktiver Sauerstoffspezies an den Penetrationsstellen zeigt. Pep1 ist zwischen verschiedenen Brandpilzarten konserviert und besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einem konservierten Kernbereich sowie einem weniger konservierten Glycin- und Serin-reichen C-Terminus. In der vorliegenden Arbeit wurde das heterolog in *E. coli* exprimierte Pep1 aufgereinigt. Durch biochemische und molekularbiologische Methoden konnten zwei pflanzliche Bindungspartner von Pep1 identifiziert. So konnte mittels Aktivitäts-basierendem Protein-*Profiling* gezeigt werden, dass Pep1 spezifisch apoplastische Papain-ähnliche Cysteinproteasen inhibiert. Diese Proteasen spielen offenbar eine wichtige Rolle in der Abwehrinduktion in der Maispflanze.

Des Weiteren bindet und inaktiviert Pep1 pflanzliche Klasse-III-Häm-Peroxidasen. In Kooperation mit Christoph Hemetsberger konnte die Hemmung der *Horseradish-Peroxidase* (HRP) durch Pep1 *in vitro* gezeigt. Außerdem konnte die physische Interaktion von Pep1 mit der HRP bewiesen werden. Während der  $\Delta pep1$ -Infektion wird eine Mais Peroxidase, die sekretierte Peroxidase-12, transkriptionell induziert. Durch Virus-induziertes-Gen-*silencing* der Peroxidase-12 konnte eine partielle Restauration des  $\Delta pep1$ -Phänotyps auf POX12si-Pflanzen bewirkt werden. So führte das *silencing* der Peroxidase-12 zu einer Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen, wie z.B. der Papillenbildung, was eine erfolgreiche Penetration der  $\Delta pep1$ -Mutante ermöglichte.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Pep1 Enzyme der basalen Pflanzenabwehr inhibiert und somit die angeborene Resistenz der Wirtspflanze gegen *U. maydis* unterdrückt.



## Summary

*Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease, depends on a variety of secreted effector proteins, to establish a biotrophic interaction with its host plant maize. The deletion of the gene *um01987*, which encodes the effector protein Pep1, leads to a complete loss of pathogenicity. Moreover the plant reacts to penetration attempts of the  $\Delta pep1$ -mutant strain with the induction of different defense reactions. This results in e.g. the formation of necrotic lesion as well as in the production of reactive oxygen species at the penetration sites. Pep1 is conserved among different species of smut fungi and contains a N-terminal signal peptide, a conserved core region as well as a low conserved glycine- and serine-rich C-terminus. In the present study, the effector protein Pep1 was heterologously expressed and purified. Via biochemical and molecular biological methods, two plant interaction partners of Pep1 were identified. By Activity based protein profiling it could be demonstrated, that Pep1 specifically inhibits the activity of papaine like cysteine proteases. Particularly, the activity of papaine like cysteine proteases, induced by the salicylic acid signaling pathway, was inhibited by Pep1 very efficiently. Obviously, these proteases are critical for the induction of maize plant defense. Additionally, Pep1 binds and inhibits plant class-III-heme-peroxidases.

In cooperation with Christoph Hemetsberger, the *in vitro* inhibition of the horseradish peroxidase (HRP) could be shown. Moreover the physical interaction of Pep1 with the HRP was demonstrated. During the  $\Delta pep1$ -infection, a single peroxidase, the maize peroxidase-12, is transcriptionally upregulated. Virus induced gene silencing of the peroxidase-12 lead to a partial complementation of the  $\Delta pep1$ -mutant phenotype on POX12si plants. Thus, silencing of peroxidase-12 leads to the suppression of plant defense reactions, such as the formation of papillae, which enables the  $\Delta pep1$ -mutant strain to successfully penetrate the plant tissue.

Taken together these results show, that Pep1 inhibits enzymes of the basal plant defense and therefore suppressing the innate immunity of maize against *U. maydis*.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Δ	Deletion	min	Minute
<i>um01987</i>	<i>U. maydis</i> -Gen welches Pep1 kodiert	N-terminal	aminoterminal
Abb.	Abbildung	NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
Amp	Ampicilin	OD <sub>600</sub>	optische Dichte gemessen bei 600 nm
AS	Aminosäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Avr	Avirulenz	PAMP	„Pathogen associated molecular pattern“ (Pathogen-assoziiertes molekulares Muster)
Bp	Basenpaare	PCR	Polymerasekettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
BSA	„bovine serum albumin“	PD	„ <i>potato dextrose</i> “
bzw.	beziehungsweise	Pep1	„protein essential during penetration 1“ (Protein essentiell während der Penetration 1)
Cam	Chloramphenicol	Phleo	„Papaine like cysteine protease“
CBD	Chitin-Binde-Domäne	PLCP	(Papain-ähnliche Cysteinprotease)
Cbx	Carboxin	Peroxidase	
cDNA	„complementary DNA“	POX	quantitative „ <i>real time</i> “
C-terminal	carboxyterminal	qRT-PCR	Polymerasekettenreaktion „ <i>relative fluorescent units</i> “ (relative fluoreszenz-Einheiten)
D	Dalton	RFU	fluoreszenz-Einheiten)
DAMP	„Microbe associated molecular pattern“ (Mikroben-assoziiertes molekulares Muster)	RG	Rosetta-gami ( <i>E. coli</i> -Stamm)
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNAi	RNA-Interferenz
dpi	Tage nach Infektion („ <i>days post infection</i> “)	RNAi	„reactive oxygen species“ (reaktive Sauerstoffradikale)
ER	Endoplasmatisches Retikulum	ROS	Sauerstoffradikale)
FW	„ <i>forward</i> “	RT	Raumtemperatur
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	RV	„ <i>reverse</i> “
GFP	„ <i>green fluorescent protein</i> “ (grün fluoreszierendes Protein)	s.	siehe
ggf.	gegebenenfalls	SA	„ <i>Salicylic acid</i> “ (Salicylsäure)
gDNA	genomische DNA	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
GST	Glutathion S-Transferase	sec.	Sekunde
h	Stunde	Tab.	Tabelle
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	Tet	Tetrazyklin
HA	Hämagglutinin	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Hyg	Hygromycin	ÜN	Über Nacht
<i>ip</i>	„iron-sulphur protein“	U	Unit (Enzymaktivität)
JA	„ <i>Jasmonic acid</i> “ (Jasmonsäure)	u.a.	unter anderem
Kan	Kanamycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobasen	UV	Ultraviolett
kDa	Kilodalton	vgl.	vergleiche
M	Molar (g/L)	VIGS	Virus-induziertes Gen- <i>silencing</i>
MAMP	„Microbe associated molecular pattern“ (Mikroben-assoziiertes molekulares Muster)	wt	Wild-Typ
MAP(K)	„ <i>mitogen-activated protein</i> “	YFP	„ <i>yellow fluorescent Protein</i> “ (gelb fluoreszierendes Protein)
MBP	Maltose-Binde-Protein		
mM	Millimolar (mg/L)		

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE .....</b>	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Grundlegende Mechanismen der Pflanzenabwehr.....	1
1.1.1 Die Rolle des oxidativen <i>Burst</i> während der Pflanzenabwehr .....	3
1.1.2 Die Bedeutung sekretierter Effektoren in der Pflanzenabwehr .....	4
1.2 Der Erreger des Maisbeulenbrandes <i>Ustilago maydis</i> .....	7
1.3 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	8
1.4 Die Bedeutung sekretierter Effektoren im <i>U. maydis</i> /Mais-Pathosystem .....	10
1.5 Der <i>U. maydis</i> Effektor Pep1.....	11
1.6 Die Rolle von Cysteinproteasen in der Pflanzenabwehr .....	13
1.7 Die Rolle von Peroxidasen in der Pflanzenabwehr.....	15
1.8 Aufgabenstellung der Arbeit.....	17
<b>2 ERGEBNISSE.....</b>	<b>19</b>
2.1 Sequenz-Analyse von Pep1 Homologen.....	19
2.2 Die N- und C-terminalen Trunkierungen von Pep1 .....	19
2.3 Heterologe Überexpression und Aufreinigung von Pep1 .....	21
2.4 Optimierung der IPTG-induzierten Überexpression in <i>E. coli</i> .....	21
2.5 Die Rolle des Pep1 C-Terminus für die <i>U. maydis</i> Virulenz.....	23
2.6 Die Bedeutung der vier konservierten Cysteine von Pep1.....	24
2.7 Identifizierung eines putativen Protease-Inhibitor-Motivs in Pep1.....	27
2.8 Aktivitäts-basiertes Protein <i>Profiling</i> .....	30
2.8.1 Aktivitäts-basiertes Protein <i>Profiling</i> auf putative Interaktionspartner von Pep1 .....	31
2.8.2 Pep1 inhibiert Papain-ähnliche Cysteinproteasen .....	32
2.8.3 Pep1 inhibiert die <i>A. thaliana</i> Cysteinprotease RD19A.....	34
2.9 Pep1 hemmt apoplastische Mais-Cysteinproteasen.....	35
2.10 Pep1 interagiert mit der <i>Horseradish</i> -Peroxidase und inhibiert Peroxidase-Aktivität.....	36

---

2.11 Die Mais-Peroxidase-12 wird während der Infektion mit den <i>U. maydis</i> -Stämmen SG200 gegenüber SG200 $\Delta$ pep1 differentiell reguliert .....	38
2.12 Das <i>silencing</i> der Mais-Peroxidase-12 führt zur partiellen Virulenz-Restauration der Pep1-Deletionsmutante .....	40
<b>3 DISKUSSION.....</b>	<b>42</b>
3.1 Heterologe Expression von Pep1 in <i>Escherichia coli</i> .....	42
3.2 Pep1 enthält zwei überlappende putative Disulfidbrücken.....	43
3.3 Pep1 ist ein konserviertes Effektorprotein .....	45
3.4 Inhibition Papain-ähnlicher Cysteinproteasen durch Pep1.....	47
3.5 Die Bedeutung der Pep1/Peroxidase-Interaktion für den oxidativen <i>Burst</i> .....	49
3.6 Pep1 inhibiert Peroxidase- und Proteaseaktivität .....	52
3.7 Bedeutung von Pep1 für die Virulenz von <i>U. maydis</i> .....	54
3.8 Ausblick .....	55
<b>4 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>57</b>
4.1 Material und Bezugsquellen .....	57
4.1.1 Chemikalien.....	57
4.1.2 Puffer und Lösungen .....	57
4.1.3 Enzyme und Antikörper.....	57
4.1.4 Verwendete Kits.....	58
4.2 Zellkultivierung.....	58
4.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	58
4.2.2 Kultivierung von <i>U. maydis</i> .....	59
4.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen.....	60
4.3 Stämme, Oligonukleotide und Plasmide.....	60
4.3.1 <i>E. coli</i> Stämme.....	60
4.3.2 <i>U. maydis</i> Stämme .....	60
4.3.3 Oligonukleotide .....	62
4.3.4 Plasmide.....	66
Plasmide zur Expression von Genen in <i>E. coli</i> .....	66
Plasmide zur Generierung von stabilen <i>U. maydis</i> Mutanten .....	69
4.4 Mikrobiologische Standardmethoden .....	73
4.4.1 Transformation.....	73
4.5 Molekularbiologische Methoden .....	76
4.5.1 <i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren.....	76
4.5.2 Sequenzierung von Nukleinsäuren .....	78

---

4.5.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	78
4.5.4	Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	79
4.5.5	Isolierung von Nukleinsäuren.....	79
4.5.6	Southern Analyse .....	81
4.5.7	cDNA-Synthese .....	83
4.5.8	Quantitative Real-Time PCR.....	83
4.6	Proteinbiochemische Methoden .....	84
4.6.1	Antikörper .....	84
4.6.2	Auftrennung und Nachweis von Proteinen .....	84
4.6.3	Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western Blot) .....	86
4.6.4	<i>Far</i> -Western Blot.....	87
4.6.5	Commassie-Proteinfärbung .....	87
4.6.6	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	87
4.6.7	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC) .....	89
4.6.8	Proteinbestimmung nach Bradford.....	90
4.6.9	<i>In vitro</i> Peroxidase-Aktivitätsmessungen.....	90
4.6.10	Aktivitäts-basiertes Protein- <i>profiling</i> .....	91
4.7	Pflanzenmethoden .....	94
4.7.1	<i>Zea mays</i> .....	94
4.7.2	Salicylsäure-Infiltration von Maisblättern .....	95
4.7.3	Isolation und Fraktionierung von apoplastischem Maisfluid.....	96
4.7.4	Protease-Aktivitätstests in apoplastischem Maisfluid .....	96
4.7.5	Tabak .....	97
4.7.6	Virus-induziertes-Gen- <i>silencing</i> .....	97
4.7.7	Mikroskopie und Bildverarbeitung .....	99
4.7.8	Bioinformatische Analysen.....	100
<b>5</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>112</b>

**DATEN CD**

# 1 Einleitung

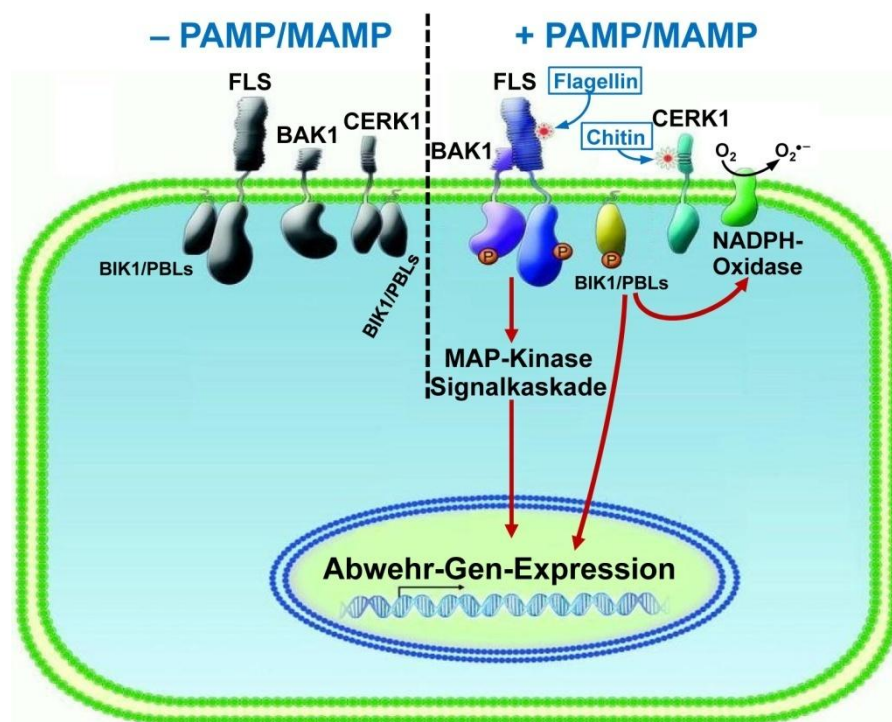
## 1.1 Grundlegende Mechanismen der Pflanzenabwehr

Pflanzen sind im Gegensatz zu den meisten Tieren ortsgebunden und können sich daher Stresssituationen, wie z.B. einer Pathogen-Attacke, nicht durch Ortswechsel entziehen. Zum Schutz sowohl vor biotischen als auch abiotischen Umweltfaktoren verfügen Pflanzen über physische Barrieren, z.B. schützende Zellwände, welche durch Lignifizierungen verstärkt werden können, oder die Cuticula, welche Austrocknung und mikrobiellen Befall minimiert (Dangl und Jones, 2001; Hückelhoven, 2007). Pflanzen verfügen nicht über ein auf Antikörpern basierendes Immunsystem, können aber dennoch spezifisch auf Verletzungen oder verschiedene Arten von Pathogenbefall reagieren. Die Reaktion läuft dabei in zwei Stufen ab (Jones und Dangl, 2006).

Die erste Stufe zielt auf die Erkennung spezifischer körperfremder Muster, sogenannter *pathogen/microbe-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs)*, wie z.B. Chitin oder Flagellin, ab, welche durch sogenannte *pathogen- bzw. pattern-recognition receptors (PRRs)* vermittelt wird (Abb. 1) (Ausubel, 2005; Zhang *et al.*, 2010). Da die Mustererkennung und die damit verbundene Aktivierung der basalen Abwehr von *PAMPs* und *MAMPs* auf den gleichen molekularen Strukturen basiert, wird zwischen beiden nicht näher unterschieden (Ausubel, 2005; Jones und Dangl, 2006; Caplan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Deller *et al.*, 2011). Eine der initialen Reaktionen im Rahmen dieser ersten Abwehrstufe ist die Bildung sogenannter Reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*), welche die erste Stufe des sogenannten oxidativen *Burst* kennzeichnet (Lamb und Dixon, 1997).

Die zweite Stufe dient der Erkennung spezifischer pathogener Aktivitäten, welche auf die aktive Suppression der Pflanzenabwehr abzielen. Werden diese durch Pathogenbefall ausgelösten Modulationen von der Pflanze erkannt, wird instantan eine massive Abwehrreaktion ausgelöst. Pflanzen induzieren hierbei die sogenannte hypersensitive Reaktion (HR), welche u.a. zur Synthese phenolischer Substanzen und Phytoalexinen (Snyder und Nicholson, 1990; Schulze-Lefert, 2004), der Deposition von Callose und Lignin (Brown *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2011), Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalkaskaden (Chandra *et al.*, 1997; van

der Biezen und Jones, 1998) sowie der gesteigerten Bildung von ROS (Jones und Dangl, 2006; Torres *et al.*, 2006) führt. Die verstärkte und länger anhaltende ROS-Produktion kennzeichnet in die zweite Phase des oxidativen *Burst* (Lamb und Dixon, 1997). Final kann die HR zum programmierten Zelltod (*programmed cell death*, PCD) führen und damit den Erreger aktiv durch Freisetzung antimikrobieller Substanzen sowie passiv durch Entzug der potentiellen Nährstoffquelle töten. Da die Reaktion lokal beschränkt ist, kommt es nur zu begrenzten nekrotischen Läsionen, jedoch zu keiner Schädigung des umliegenden Pflanzengewebes (Greenberg, 1997; Lamb und Dixon, 1997; Coll *et al.*, 2011).



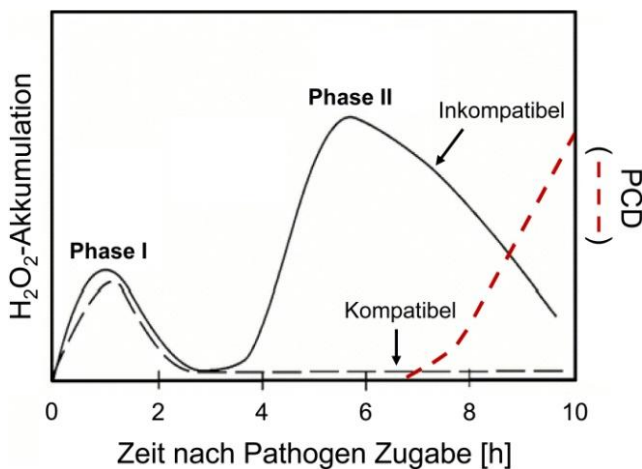
**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung basaler Mechanismen der Pflanzenabwehr nach PAMP/MAMP-Perzeption.** PRRs (*pathogen/pattern-recognition receptors*) bilden einen Komplex mit Kinasen wie BIK1 (Botrytis-induzierte Kinase 1) oder PBL (*AvrPphB susceptible*). Exemplarisch sind die PAMP-Rezeptoren FLS (*Flagellin-sensing receptor*) sowie CERK1 (*Chitin Elicitor Rezeptor Kinase 1*) dargestellt. Durch Bindung an entsprechende PAMP/MAMPs erfolgt die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors. Dadurch werden der Rezeptor selbst und/oder angelagerte Kinasen phosphoryliert. Dies führt zur Aktivierung der Pflanzenabwehr durch direkte oder MAP-Kinasen-vermittelte Induzierung von Abwehrgenen sowie die Aktivierung von Enzymen, wie z.B. der NADPH-Oxidase, welche an der Pflanzenabwehr beteiligt sind (Abbildung verändert nach Zhang & Zhou *et al.* (2010)).

Neben der Immunantwort auf diese exogenen Elizitoren zeigen Pflanzen aber auch Abwehrreaktionen gegenüber endogenen Elizitoren. Diese körpereigenen Gefahrensignale, sogenannte *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs), führen ebenfalls zur Induktion der Pflanzenabwehr. Zur DAMP-Freisetzung kann es sowohl durch abiotische Faktoren, wie z.B. Verletzungen,

erhöhte Ozonkonzentrationen oder UV-Strahlung, als auch durch biotische Faktoren, etwa durch die Attacke von Fraßfeinden, kommen (Lotze *et al.*, 2007).

### 1.1.1 Die Rolle des oxidativen *Burst* während der Pflanzenabwehr

Reaktive Sauerstoffspezies sind Schlüssel-moleküle der Pflanzenabwehr. Aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit wirken die meisten ROS toxisch, da sie durch oxidative Angriffe Proteine, Lipide oder DNA schädigen (Apel und Hirt, 2004).  $H_2O_2$ , welches reaktionsträger und dadurch stabiler als die meisten ROS ist, erfüllt zudem weitere Funktionen. So wirkt das Radikal als *second messenger* und spielt bei der Aktivierung von R-Genen eine wichtige Rolle. Zudem ist es ein essentieller Faktor bei der Peroxidase-vermittelten Zellwandverstärkung durch Papillenbildung (Lamb und Dixon, 1997; Wojtaszek *et al.*, 1997; Apel und Hirt, 2004; Rhee *et al.*, 2005; Hüchelhoven, 2007). Wie bereits beschrieben, gliedert sich die pflanzliche Immunantwort in zwei Stufen. Als Teil der Abwehrreaktion ist der oxidative *Burst* ebenfalls in zwei Phasen unterteilt (Abb. 2) (Lamb und Dixon, 1997).



**Abbildung 2: Repräsentative Kinetik der  $H_2O_2$ -Akkumulation während des pflanzlichen oxidativen *Burst* in Abhängigkeit der Interaktionsart.**  $H_2O_2$ -Akkumulation nach Zugabe eines kompatiblen virulenten (—) bzw. eines inkompatiblen avirulenten Pathogens (---). Nur im Rahmen einer inkompatiblen Interaktion kommt es zur Induktion einer zweiten *Burst*-Phase, verbunden mit PCD im betroffenen Gewebe. (Abbildung modifiziert nach Lamb & Dixon (1997) sowie Baker & Orlandi (1995))

Charakteristisches Merkmal der ersten Phase ist die, innerhalb weniger Minuten nach PAMP/MAMP-Erkennung stattfindende, Induktion der ROS-Produktion. Möglich ist dies, da die Abwehrreaktion auf präformierten Abwehrmechanismen beruht (Mehdy, 1994). Parallel erfolgt die Neusynthese der für den oxidative *Burst* benötigten Proteine und Substrate, um die Reaktion zu verstärken (Apostol *et al.*, 1989; Mehdy, 1994; Lamb und Dixon, 1997; Daudi *et al.*, 2012). Da die Menge gebildeter Radikale relativ gering ist, induziert diese Stufe des oxidativen *Burst* keinen PCD (Baker und Orlandi, 1995).



In der zweiten Phase des oxidativen *Burst*, welche in der Regel 2-3 h nach Interaktionsbeginn induziert wird, ist die Menge gebildeter ROS größer (Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997). Diese Phase des *Burst* wird nur im Rahmen inkompatibler Interaktionen als Teil der Immunantwort gegenüber pathogenen Effektoren während der Effektor-induzierten Immunreaktion ausgelöst (vgl. 1.1.2). Die zweite Phase des oxidativen *Burst* geht zudem mit der Aktivierung des SA-Signalweges und der Induktion der HR einher. Letztlich führt diese Reaktion zum PCD im betroffenen Gewebe (Lamb und Dixon, 1997; Dong, 2004; Jones und Dangl, 2006).

### 1.1.2 Die Bedeutung sekretierter Effektoren in der Pflanzenabwehr

Phytopathogene werden anhand ihrer Ernährungsstrategien in nekrotrophe oder biotrophe Erreger eingeordnet. Nekrotrophe Mikroorganismen töten das infizierte Gewebe und ernähren sich anschließend vom toten Material (Glazebrook, 2005; Rowe und Kliebenstein, 2010). Im Gegensatz dazu besiedeln biotrophe Mikroorganismen das lebendige Wirtsgewebe. Hierbei kommt es neben der Unterdrückung der Pflanzenabwehr zur Modulation ganzer Stoffwechselwege, welche neben der Nährstoffversorgung auch strukturelle Änderungen des Pflanzengewebes mit sich bringen können (Glazebrook, 2005; Doehlemann *et al.*, 2008b). Manche Spezies wechseln während des Infektionsverlaufes von einer Ernährungsstrategie zu anderen und werden daher als Hemibiotrophe bezeichnet (Glazebrook, 2005).

Um die Pflanzenabwehr aktiv zu unterdrücken oder gegebenenfalls Gewebe für eine biotrophe Interaktion umzuprogrammieren, besitzen pathogene Mikroorganismen spezifische Proteine, sogenannte Effektoren, welche in das Wirtsgewebe sekretiert werden und zum Teil auch in die Wirtszellen translozieren (Jones und Dangl, 2006; Kamoun, 2006). So sekretiert z.B. das Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* kurz nach der Invasion durch die Stomata der Pflanze die Effektoren Avr4 und Ecp6 (van den Burg *et al.*, 2004; de Jonge *et al.*, 2010). Avr4 bindet anschließend an das Chitin der pilzlichen Zellwand und schützt diese dadurch vor dem Abbau durch pflanzliche Chitinasen. Der zweite Effektor, das Lys-M Protein Ecp6, erfüllt eine ähnliche, offenbar ergänzende Funktion. Im Gegensatz zu Avr4 ist die Affinität von Ecp6 gegenüber kürzeren Chitin-Oligosacchariden höher

als zu Chitin selbst. Durch gleichzeitige Sekretion beider Effektoren umgeht der Pilz somit die PAMP-Erkennung von Chitin und/oder Chitin-Oligosacchariden durch die Pflanze (de Jonge *et al.*, 2011).

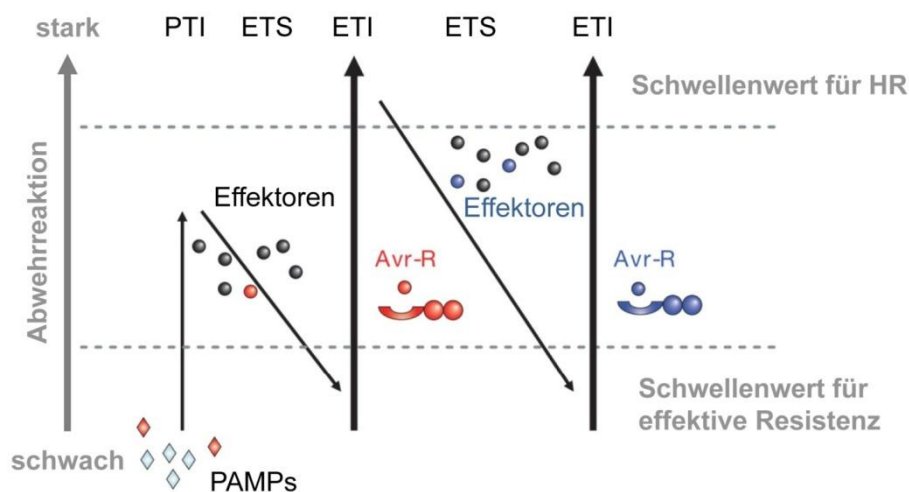
Im Verlauf der Coevolution von Pflanzen und Pathogenen entwickelten die Pflanzen hochspezialisierte (Rezeptor)Proteine, welche die Effektorproteine der Pathogene erkennen und deren Wirkung neutralisieren. Da diese Proteine Resistenz vermitteln, werden sie als Resistenzproteine (R-Proteine) bezeichnet. Ein Beispiel für eine solche spezifische Interaktion ist das von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) exprimierte (*cf*)-4-Gen, dessen Genprodukt Cf-4 direkt den *C. fulvum* Effektor Avr4 bindet. Der Cf-4/Avr4-Komplex wiederum induziert die Bildung von Phosphatidsäure, welche als *lipid second messenger* vermutlich indirekt zur Induktion des oxidativen *Burst* führt (de Jong *et al.*, 2004).

Ein weiteres Beispiel für die andauernde coevolutionäre Wechselbeziehung zwischen Wirtspflanzen und Pathogenen ist die Interaktion zwischen der Kartoffelpflanze und dem hemibiotrophen Oomyceten *Phytophthora infestans*. Einer der durch das Pathogen sekretierten Effektoren ist Avr3a (Armstrong *et al.*, 2005). Der Effektor bindet an das *P. infestans* Elicitorprotein Infestin-1 (Inf-1), um dessen Erkennung durch das Immunsystem der Wirtspflanze zu verhindern. Inf-1 bindet wiederum an die E3-Ubiquitin-Ligase CMPG1. Die Bindung von Inf-1 an CMPG1 führt vermutlich zum proteosomalen Abbau von CMPG1 und infolge dessen zur Aktivierung des PCD in der betroffenen Pflanzenzelle (Bos *et al.*, 2010). Anschließend ernährt sich *P. infestans* vom abgestorbenen Pflanzenmaterial (Lee und Rose, 2010).

Avr3a kommt in zwei Varianten vor, Avr3a<sup>KI</sup> und Avr3a<sup>EM</sup>, welche durch zwei Allele kodiert werden und sich lediglich durch den Austausch zweier Aminosäuren an den Positionen 80 und 103 voneinander unterscheiden. Dieser Austausch führt dazu, dass Avr3a<sup>KI</sup>, nicht aber Avr3a<sup>EM</sup> durch das pflanzliche R-Protein R3a erkannt und die beschriebene zweite Stufe der pflanzlichen Immunantwort ausgelöst wird.

An den Beispielen von Avr4 und Avr3a wird deutlich, dass Pflanze auf sekretierte Effektoren durch die Entwicklung spezifischer antagonistisch wirkender R-Proteine reagieren kann. Da diese Reaktionen in Folge der Effektorerkennung induziert werden, bezeichnet man diese Stufe der Immunantwort als *effector triggered immunity* (ETI) (Armstrong *et al.*, 2005; Bos *et al.*, 2010). Am Wechselspiel

zwischen Effektoren und deren Erkennung durch R-Proteine zeigt sich das zwischen Pflanzen und Pathogenen stattfindende „evolutionäre Wettrüsten“ (Stahl und Bishop, 2000). Die grundlegenden Mechanismen wurden bereits vor über 60 Jahren von Harold Flor in seiner Gen-für-Gen-Hypothese beschrieben (Flor, 1942). Da in vielen Fällen die direkte Interaktion von Avirulenzproteinen und den korrespondierenden R-Proteinen experimentell nicht bestätigt werden konnte, wurde die sogenannte Wächter (*Guard*)-Hypothese entwickelt (van der Biezen und Jones, 1998; Dixon *et al.*, 2000; Dangl und Jones, 2001; de Wit *et al.*, 2009). Diese geht davon aus, dass R-Proteine nicht direkt mit einem Virulenzfaktor interagieren müssen, um diesen zu „erkennen“, sondern dass R-Proteine ihre Zielproteine z.B. durch direkte Bindung bewachen oder Effektor-generierte enzymatische Produkte



**Abbildung 3: Das ZigZag-Modell beschreibt die verschiedenen Phasen der pflanzlichen Immunantwort gegenüber sekretierten Effektoren von Pathogenen.** In Phase 1 kommt es zur PAMP-Erkennung durch die Pflanze. Entsprechend ausgelöste pflanzliche Abwehrreaktionen führen zur PAMP-induzierten Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI). In Phase 2 wird diese Immunität durch vom Pathogen sekretierte Effektoren gebrochen, was zur Vermittlung der effektorinduzierten Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS) führt. Verfügt die Pflanze über spezifische R-Proteine, kommt es in Phase 3 zu einer noch stärkeren Abwehrreaktion seitens der Pflanze. Diese effektorinduzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) überschreitet den Schwellenwert zur HR und kann zum PCD führen. Pathogene können durch Sekretion anderer Effektoren ETI verhindern oder unter den Schwellenwert einer effektiven Resistenz drücken. Um dem entgegenzuwirken, entwickeln Pflanzen wiederum angepasste R-Proteine, welche auf diese neuen Effektoren reagieren. (Abbildung verändert nach Jones & Dangl (2006))

detektieren (Leister und Katagiri, 2000; Dangl und Jones, 2001; Shao *et al.*, 2003).

Aufgrund der Koevolution von Pflanzen und Pathogenen unterliegen Effektoren und R-Proteine einem starken diversifizierenden Selektionsdruck. So kommt es kontinuierlich zur Modifikation der bestehenden sowie zur Entwicklung neuer Effektoren und R-Proteine. Diese fortwährenden Anpassungen aneinander wurden von Jones und Dangl (2006) im sogenannten ZigZag-Modell zusammengefasst (Abb. 3).

## 1.2 Der Erreger des Maisbeulenbrandes *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Heterobasidiomycet *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes. Er gehört der Klasse der *Ustilaginomycetes*, Ordnung *Ustilaginales* und innerhalb dieser der Familie der *Ustilaginaceae* (Brandpilze) an. Die Klasse der *Ustilaginomycetes* umfasst mehr als 1400 Arten phytopathogener Basidiomyceten, von denen einige erheblichen wirtschaftlichen Schaden verursachen, da sie Kulturpflanzen, wie die Süßgräser Hafer, Weizen, Zuckerrohr oder Mais, befallen (Kahmann *et al.*, 2000; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002; Begerow *et al.*, 2006). Charakteristisch für die Familie der Brandpilze ist, dass sie ein sehr enges, z.T. nur auf eine Pflanzenart festgelegtes Wirtsspektrum haben. So befällt *U. maydis* lediglich Mais (*Zea mays*) sowie dessen Urform Teosinte (*Zea mays ssp. Mexicana* und *ssp. pavigluminis*) (Christensen, 1963; Doebley, 1992). Das Ursprungsgebiet des Maisbeulenbrandes ist der süd- und mittelamerikanische Raum, welches gleichzeitig das Ursprungsgebiet der Wirtspflanze Mais ist. Untersuchungen an vier verschiedenen monophyletischen Brandpilzen (*U. maydis*, *U. scitaminea*, *Sporisorium reilianum*, *S. sorghi*) ergaben, dass durch koevolutionäre Prozesse die Anpassungen an die spezifischen Wirtspflanzen bereits vor mehreren Millionen Jahren stattfanden (Munkacsı *et al.*, 2007).

Als fakultativ biotropher Parasit ist *U. maydis* auf lebendes Wirtsgewebe angewiesen, um seinen Lebenszyklus zu vollenden. Dem entsprechend besitzt der Pilz auch keine destruktiven Virulenzmechanismen, welche auf die Zerstörung der Wirtspflanze abzielen (Kämper *et al.*, 2006). Die Infektion der Maispflanzen durch *U. maydis* kann an allen oberirdischen Pflanzenteilen auftreten. Erste sichtbare Symptome sind das Ausbleichen der befallenen Bereiche (Chlorosen) sowie die Induktion der Anthocyanbildung in infizierten Blättern. Etwa sechs Tage nach der Infektion ist die Ausbildung tumorartiger Strukturen, welche als Tumore bzw. Gallen bezeichnet werden zu beobachten (Christensen, 1963). Innerhalb des Tumorgewebes kommt es zur massenhaften Produktion von Teliosporen, in deren Zellwänden während der Reifung Melanin eingelagert wird (Ramberg und McLaughlin, 1980; Odonnell und McLaughlin, 1984). Beim Aufplatzen der Tumore werden die dunkel pigmentierten Sporen freigesetzt. Auf diesem charakteristischen Krankheitsbild mit großen, z.T. verbrannt („ustilare“, lat. verbrennen) wirkenden Tumoren beruht auch die Namensgebung Maisbeulenbrand (Abb. 4).

Während der Pilz in den meisten Teilen der Welt als Schädling angesehen wird, gelten die ungiftigen Pflanzentumore in Mittel- und Südamerika als Delikatesse. Dort wird der Pilz bereits seit der Zeit der Azteken auf Maispflanzen kultiviert und die Tumore unter dem Namen „Huitlacoche“ zum Verzehr angeboten (Valverde *et al.*, 1995).

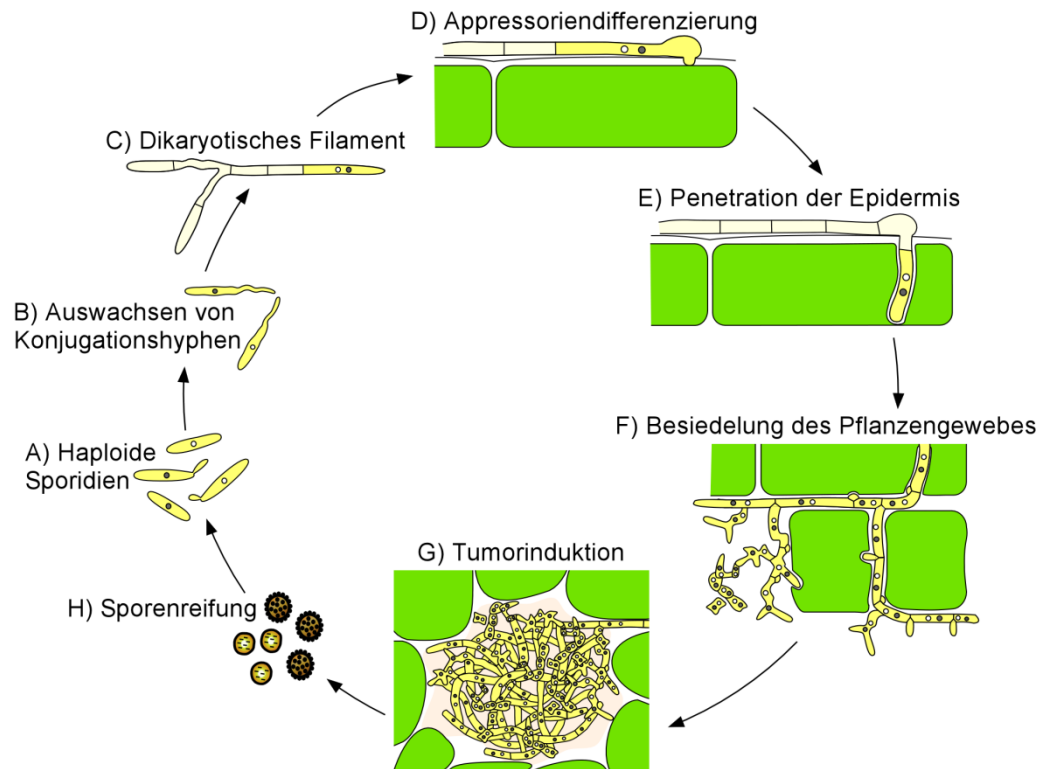


**Abbildung 4: Tumorbildung in einer weiblichen Maisblüte durch Infektion mit *U. maydis*.** (Foto: Rolf Rösser)

Abgesehen von diesen wirtschaftlichen Interessen wurde *U. maydis* in den letzten 15 Jahren zu einem wichtigen Modellorganismus für die Erforschung biotropher Pflanzen-pathogene. Insbesondere die leichte Kultivierbarkeit der Sporidien unter axenischen Bedingungen im Labor sowie die Tatsache, dass der gesamte Lebenszyklus auf der Pflanze binnen drei Wochen nachvollzogen werden kann, zeichnen *U. maydis* als Modellorganismus aus (Banuett, 1995). Die Entschlüsselung des *U. maydis* Genoms in Verbindung mit dessen effizientem System der homologen Rekombination und die Entwicklung einer Vielzahl biochemischer sowie zell- und molekularbiologischer Methoden, welche genetische Manipulationen der haploiden Sporidien ermöglichen, etablierten das *U. maydis/Zea mays* Pathosystem als exzellentes Modellsystem in der molekularen Phytopathologie (Banuett und Herskowitz, 1996; Kahmann *et al.*, 2000; Kämper, 2004; Kämper *et al.*, 2006).

### 1.3 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

*U. maydis* durchläuft einen biphasischen Lebenszyklus (Kahmann *et al.*, 2000). Die haploiden Sporidien wachsen zunächst saprophytisch und vermehren sich asexuell durch hefeartige Knospung. Treffen auf einer geeigneten Wirtsoberfläche zwei kompatible Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps aufeinander, können diese fusionieren und somit das infektiöse Dikaryon bilden (Gillissen *et al.*, 1992; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009) (Abb. 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*.** Der Lebenszyklus von *U. maydis* ist in ein saprophytisches (A-C) und ein biotrophes Stadium (D-H) unterteilt. Während des saprophytischen Stadiums wächst *U. maydis* durch hefeartige Knospung (A-C). Nach der Fusion kompatibler Sporidien bildet sich ein dikaryotisches Filament, das die Pflanze mit Hilfe eines Appressoriums penetriert (E). Die Hyphenproliferation findet sowohl intra-, als auch interzellulär im Apoplasten der Pflanze statt, wobei es zu keiner Beschädigung der Wirtszellen kommt (F). Schließlich bildet der Pilz große Aggregate im Apoplasten, was äußerlich an der Bildung großer Pflanzentumore sichtbar wird (G). In diesem Stadium erfolgen Karyogamie sowie Hyphenfragmentierung und es entwickeln sich diploide Sporen. Durch Aufplatzen des Tumorgewebes werden die reifen Sporen freigesetzt. Unter geeigneten Bedingungen können sie auskeimen, die Meiose durchlaufen und haploide Sporidien bilden. (Abbildung verändert nach Kämper *et al.* (2006) und Doehlemann *et al.* (2008b))

Das Zusammentreffen auf der Blattoberfläche wird durch ein Pheromon-Rezeptor-System ermöglicht. Dieses wird durch den bi-allelischen Kreuzungstyplokus kodiert und vermittelt die Zell/Zell-Erkennung und die spätere Fusion der Sporidien (Bölker *et al.*, 1992). Kommt es zur Pheromonperzeption, wird die Ausbildung von Konjugationshyphen initiiert. Diese wachsen polar entlang des Pheromongradienten aufeinander zu und fusionieren an ihren apikalen Spitzen zu einem dikaryotischen Filament (Snetselaar und Mims, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Nach erfolgreicher Fusion wird ein zweiter, multi-allelischer Kreuzungstyplokus aktiviert. Der sogenannte *b*-Lokus kodiert die beiden Homeodomänen-Proteine *bE* (*bEast*) und *bW* (*bWest*), die nur fusionieren, wenn sie von unterschiedlichen Allelen kodiert werden (Gillissen *et al.*, 1992; Brachmann *et al.*, 2001). Das daraus hervorgehende aktive Heterodimer ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle bei der

Regulation der Expression pathogenitätsrelevanter Gene spielt (Kämper *et al.*, 1995; Schlesinger *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2001; Bakkeren *et al.*, 2008).

Das dikaryotische Filament wächst nun auf der Blattoberfläche durch Einzug von Septen am distalen Ende, wobei leere Hyphensegmente zurückbleiben. Die mit Zytoplasma gefüllte Spitzenzelle differenziert anschließend an einer geeigneten Stelle der Pflanzenoberfläche und bildet eine als Appressorium bezeichnete terminale Verdickung (Snetselaar und Mims, 1992; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Die Penetration der Pflanzenzellwand wird vermutlich nicht durch mechanischen Druck, sondern durch von *U. maydis* sekretierte lytische Enzyme ermöglicht (Schirawski *et al.*, 2005). Anschließend wächst die penetrierende Hyphe ohne direkten Kontakt zum Zytoplasma interzellulär durch Invaginierung der pflanzlichen Plasmamembran. Essentiell für das Überleben der Hyphe sowie die Etablierung der biotrophen Interaktion ist hierbei die Unterdrückung der basalen Pflanzenabwehr (Doehlemann *et al.*, 2008a; Doehlemann *et al.*, 2009). Um dies zu gewährleisten, sekretiert *U. maydis* ab dem Zeitpunkt der Penetration verschiedene Effektoren in die biotrophe Interaktionszone, um die erforderlichen Modulationen von Pflanzenabwehr und Änderungen des pflanzlichen Metabolismus zu bewirken (Doehlemann *et al.*, 2009; Djamei *et al.*, 2011; Doehlemann *et al.*, 2011).

#### **1.4 Die Bedeutung sekretierter Effektoren im *U. maydis*/Mais-Pathosystem**

Durch die Entschlüsselung des *U. maydis*-Genoms im Jahr 2006 (Kämper *et al.*, 2006) und anschließenden *in silico* Analysen wurden 554 potentiell sekretierte Proteine identifiziert. Für 168 dieser Proteine konnte eine mögliche enzymatische Funktion vorhergesagt werden. Im Einklang mit der biotrophen Lebensweise von *U. maydis* wurden relativ wenige lytisch wirkende Proteine mit putativ degradierender Wirkung, etwa gegenüber Zellwänden vorhergesagt. Dementsprechend ist die Zahl sekretierter Lipasen, Proteasen oder Phytasen stark limitiert. Vielmehr spielen eine Vielzahl der durch *U. maydis* sekretierten Enzyme, wie z.B. Xylanasen, Pektin-Hydrolasen oder Glucanasen, vermutlich im Rahmen Zellwand-Modifikationen eine Rolle (Kämper *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2008).

Zu den verbleibenden 386 Proteinen konnten aufgrund fehlender Homologien zu bereits bekannten Proteinen keine Vorhersagen gemacht werden (Müller *et al.*, 2008). Ca. 90 dieser Proteine sind in zwölf Genclustern von mindestens drei Genen organisiert, und werden spezifisch ab dem Zeitpunkt der Kolonisierung der Pflanze durch *U. maydis* transkriptionell induziert (Kämper *et al.*, 2006).

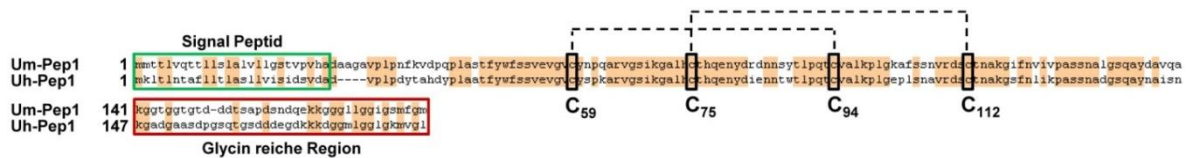
Bisher wurde neben den durch Kämper *et al.* (2006) beschriebenen Genclustern lediglich ein weiterer, für die Pathogenität essentieller Gencluster identifiziert (Doehlemann *et al.*, 2011). Dieser enthält die vier *pit* (proteins important for tumors)-Gene, von welchen zwei (Pit2 und Pit4) für putativ sekretierte Effektoren kodieren. Einzeldelationen des sekretierten Effektors Pit1 sowie des in der *U. maydis* Plasmamembran lokalisierenden Pit2 führen zum Verlust der Pathogenität von *U. maydis*. Die Funktionen beider Effektoren sind jedoch noch unklar, allerdings scheinen beide funktionell miteinander verknüpft zu sein (Doehlemann *et al.*, 2011). Vor kurzem wurde eine durch *U. maydis* sekretierte Chorismatmutase identifiziert; ein Enzym, welches nach Translokation ins Zytoplasma der Pflanze in deren Shikimatweg eingreift und die Umwandlung von Chorismat zu Phrephenat katalysiert. Somit steht weniger Chorismat für die Synthese von Salicylsäure (Salicylic acid, SA) zur Verfügung, was die SA-abhängige Pflanzenabwehr negativ beeinflusst. Die Chorismatmutase gelangt über Plasmodesmata in benachbarte Pflanzenzellen und führt auch hier zur Unterdrückung der Pflanzenabwehr (Djamei *et al.*, 2011). *U. maydis* verfügt über eine Vielzahl sekretierter Effektoren, deren Transkription während der Kolonisierung der Pflanze einer distinkten Regulation unterliegt. So benötigt der Pilz in verschiedenen Pflanzenorganen entsprechend unterschiedliche Effektoren, um gewebespezifische Modulationen der Wirtsabwehr bzw. des Wirtsmetabolismus induzieren zu können (Skibbe *et al.*, 2010).

## 1.5 Der *U. maydis* Effektor Pep1

Ein nicht in einem typischen Virulenzcluster kodierter Effektor ist das 178 Aminosäuren lange, sekretierte Protein Pep1 (*protein essential during penetration 1*). Das *pep1* Gen liegt auf Chromosom 3 des *U. maydis* Genoms, enthält keine Introns und ist in der MUMDB (MIPS *Ustilago maydis* DataBase) unter der Bezeichnung *um01987* hinterlegt (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>). Es befinden sich keine Paraloge von *pep1* im



*U. maydis* Genom Eine Domänenanalyse mittels des Proteindomänen-Identifikationsprogrammes SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) zeigt ein N-terminales Signalpeptid mit einer Länge von 26 Aminosäuren. Weitere funktionelle Domänen innerhalb des Proteins werden nicht vorhergesagt. Allerdings gibt es in mehreren verwandten Spezies Homologe von Pep1, welche einen hohen Konservierungsgrad aufweisen. Einer der nächsten Verwandten von *U. maydis* ist das Gerstenpathogen *Ustilago hordei*. Sequenzanalysen von *U. maydis* und *U. hordei*-Pep1 zeigten eine konservierte Kernregion innerhalb des Proteins, welche unter anderem vier Cysteine enthält (Abb. 6) (Doehlemann *et al.*, 2009). Der C-terminale Bereich von Pep1 weist einen hohen Gehalt an Glycin sowie weiteren unpolaren Aminosäuren auf.



**Abbildung 6: Sequenzvergleich von *U. maydis* und *U. hordei* Pep1.** Grüner Rahmen: Signalpeptid-Regionen der Pep1 Homologe mit einer Länge von 26 Aminosäuren. Roter Rahmen: Glycin-reiche Region von Pep1. Schwarze Rahmen: Position der vier konservierten Cysteine mit Lage der zwei putativen sich überlappenden Disulfidbrücken (Gestrichelte Linien). Identische Bereiche sind orange hinterlegt (Sequenzvergleich mittels „Sequence Assembly“/FastScan Method, Clonemanger 9.0; modifiziert nach (Doehlemann *et al.*, 2009).

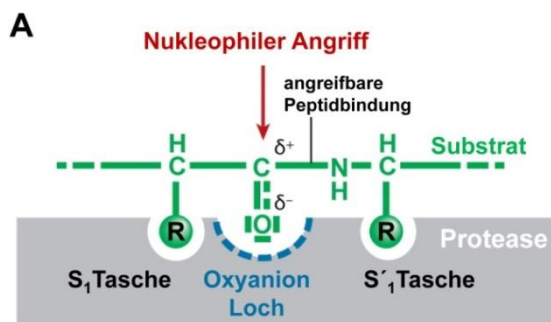
Pep1 wird ab dem Zeitpunkt der Penetration des Maisgewebes transkriptionell induziert. Mittels Pep1-GFP- und mCherry-Fusionen konnte gezeigt werden, dass das Protein in die biotrophe Interaktionszone zwischen Pilz und Pflanze in den Apoplasten sekretiert wird. Typisch ist dabei eine Akkumulation in Wuchsrichtung an der Hyphenspitze sowie an Zell/Zell-Passagen. Eine Translokation ins Zytoplasma der Wirtszellen konnte nicht beobachtet werden (Doehlemann *et al.*, 2009).

Pep1 stellt einen essentiellen Faktor zur Etablierung der Biotrophie zwischen *U. maydis* und seiner Wirtspflanze Mais dar. Die Deletion von *pep1* führt zur völligen Avirulenz von *U. maydis*.  $\Delta pep1$ -Mutanten weisen keinerlei pleiotrope Phänotypen auf. Während der Penetration der Wirtsepidermis kommt es jedoch zu einer massiven Induktion der Pflanzenabwehr, welche in einer HR mündet. In Folge dessen ist der  $\Delta pep1$ -Phänotyp makroskopisch durch das Auftreten nekrotischer Läsionen auf der Blattoberfläche gekennzeichnet. Mikroskopisch sind die typischen HR-Abwehrreaktionen an den Penetrationsstellen, wie z.B. Papillen-bildung oder eine massive ROS-Produktion, nachweisbar (Doehlemann *et al.*, 2009). Interessant

ist zudem, dass im Vergleich zu Wildtypinfektionen, welche mit der für kompatible Interaktionen typischen Aktivierung des Jasmonsäure (JA)-Signalweges einhergehen, während der  $\Delta pep1$ -Infektion der antagonistisch wirkende SA-Signalweg aktiviert wird, was typisch für inkompatible Pathogen/Wirts-Interaktionen ist (Beckers und Spoel, 2006; Doehlemann *et al.*, 2009).

## 1.6 Die Rolle von Cysteinproteasen in der Pflanzenabwehr

Wie in allen Organismen haben Proteasen auch bei Pflanzen Schlüsselfunktionen in allen wichtigen biologischen Prozessen, wie z.B. der Meiose, der Embryogenese, der Chloroplasten-Biogenese oder auch der Pathogenabwehr. Ihre Aktivierung unterliegt dabei einer strikten räumlichen und zeitlichen Regulation (van der Hoorn, 2008). Der Reaktionsmechanismus aller Proteasen basiert auf dem gleichen molekularen Prinzip, bei welchem die Carbonylgruppe der Peptidbindung des Substrats durch Stabilisierung des Carbonyl-Sauerstoffs im sogenannten Oxyanion-Loch für einen nukleophilen Angriff zugänglich gemacht wird. Je nach Art des Nucleophils, welches den Angriff durchführt, unterscheidet man zwischen Cystein-, Serin-, Aspartat- und Metalloproteasen (Abb. 7) (Rappay, 1989; van der Hoorn, 2008). Innerhalb dieser vier großen Klassen werden Proteasen, basierend auf



**Abbildung 7: Katalysemechanismus der vier großen Proteaseklassen. (A)** Das Substratprotein (grün) bindet über Aminosäurereste (R) in der Substratbindedomäne der Protease (grau), durch Interaktion mit den Substrat-Bindetaschen (S) des Enzyms. Gleichzeitig wird die Carbonylgruppe, welche an die zu spaltende Peptidbindung grenzt, im sogenannten Oxyanion-Loch (blau) polarisiert. Diese Ausrichtung des Substrats führt dazu, dass die betreffende Peptidbindung energetisch destabilisiert und die Carbonylgruppe für einen nukleophilen Angriff zugänglich wird. **(B)** Die Hauptunterschiede zwischen den Proteaseklassen basieren auf den verschiedenen Nucleophilen und Oxyanion-Stabilisatoren. Cystein- und Serinproteasen nutzen einen Cystein- oder Serinrest als Nucleophil, welcher durch ein Histidin des aktiven Zentrums aktiviert wird. Das Oxyanion-Loch wird in allen Reaktionen durch zwei Aminosäurereste des Protease-backbone stabilisiert. Metallo- und Aspartatproteasen nutzen keinen Aminosäurerest als Nucleophil. Sie polarisieren durch Aspartat bzw. ein Metallion Wasser, welches als Nucleophil dient. (Abbildung verändert nach v. d. Hoorn (2008))

**B**

Katalytische Klasse	Nucleophil	Oxyanion Stabilisator
Cysteinprotease	Cys-His	-NH-(2x)
Serinprotease	Ser-His	-NH-(2x)
Aspartatprotease	H <sub>2</sub> O-Asp	H <sup>+</sup> -Asp
Metalloprotease	H <sub>2</sub> O-Me <sup>2+</sup>	Me <sup>2+</sup>

strukturellen und evolutionären Kriterien, in Familien und Klans unterteilt. Eine hierarchische Auflistung der meisten bekannten Proteasen und ihrer zugehörigen Inhibitoren ist in der MEROPS-Datenbank des Sanger-Instituts hinterlegt (<http://merops.sanger.ac.uk>, (Rawlings *et al.*, 2008)).

Aufgrund ihrer Schlüsselfunktionen stellen Proteasen Ziele sekretierter Effektoren dar. So werden die sekretierten Cysteinproteasen Pip1 und Rcr3, welche im Apoplasten der Tomate vorliegen, gezielt durch Effektoren zweier Pathogene inhibiert. So wird Pip1 durch Epic2B, einem Effektor von *P. infestans*, und Rcr3 durch Avr2, einem Effektor von *C. fulvum*, inhibiert (Kruger *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2007). Allerdings wird die Interaktion zwischen Rcr3 und Avr2 durch das R-Protein Cf-2 erkannt, welches daraufhin die HR vermittelt (Kruger *et al.*, 2002; Rooney *et al.*, 2005).

Ein weiteres Beispiel, welches die besondere Rolle von Cysteinproteasen während der pflanzlichen Immunantwort verdeutlicht, ist Papain. Diese Protease ist Namensgeber einer ganzen Familie von Cysteinproteasen, den sogenannten *Papaine like cysteine proteases* (PLCPs, Protease-Familie C1A) (Beers *et al.*, 2004). Die Protease wurde aus dem Latex der Papaya (*Carica papaya*) isoliert, in welchem sie in großen Mengen vorkommt (Kimmel und Smith, 1954; Konno *et al.*, 2004). Mit Hilfe eines spezifischen Cysteinprotease-Inhibitors, dem Epoxid E-64, konnte gezeigt werden, dass insbesondere Cysteinproteasen während der Abwehr von Fressfeinden unmittelbar wirken (Konno *et al.*, 2004). E-64 hemmt PLCP's durch Ausbildung einer kovalenten Bindung an der Thiolgruppe des aktiven Zentrum irreversibel (Hanada *et al.*, 1978; Matsumoto *et al.*, 1989). Daher wurden Papayablätter mit dem Inhibitor behandelt und anschließend an Insektenlarven verfüttert. Larven, die mit E-64-behandelten Papaya-Blättern gefüttert wurden, wuchsen schneller als Kontrolllarven, welche mit unbehandelten Blättern gefüttert wurden (Konno *et al.*, 2004). Papayalatex enthält neben PLCP's weitere antimikrobiell wirkende Enzyme und chemische Substanzen, wie z.B. Chitinasen, Peroxidasen sowie Terpenoide und Alkaloide. Auch andere Pflanzensäfte, wie apoplastische Fluids und Xylemsäfte, weisen eine ähnliche Komposition antimikrobieller Enzyme/Substanzen auf (Howard und Glazer, 1969; Farrell *et al.*, 1991; Sessa *et al.*, 2000; Sethi *et al.*, 2009). Am Beispiel der Insektenlarven wird allerdings deutlich, dass die Inhibition der Cysteinproteasen ausreicht, um die Suszeptibilität gegenüber Fressfeinden signifikant zu steigern. Folglich spielen

Cysteinproteasen eine besondere Rolle im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort (Alvarez *et al.*, 2006; Shindo und van der Hoorn, 2008; Konno, 2011). In Mais wurden die PLCP's Mir1 bis 3 identifiziert, wobei für Mir1 eine Funktion vergleichbar mit der des Papaines gezeigt werden konnte (Pechan *et al.*, 1999; Pechan *et al.*, 2002). Insektenlarven, die mit transgenem, Mir1-überexprimierendem Maiskallus gefüttert wurden, zeigten eine gehemmte Entwicklung (Pechan *et al.*, 2002). Die Analyse der sogenannten peritrophen Matrix, einem Chitin-haltigen Bestandteil des Darmepithels dieser Insekten, zeigte, dass das Gewebe nach der Fütterung stark angegriffen war. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich die Protease über eine Chitin-Bindedomäne an der peritrophen Matrix festsetzen kann. Die Protease akkumuliert kurz nachdem Fressfeinde die Pflanze befallen im betroffenen Gewebe und ist dort auch noch mehrere Tage nach dem Befraß in großen Mengen nachweisbar (Pechan *et al.*, 2002).

Die angeführten Beispiele zeigen, dass die Funktionen von Proteasen im Rahmen der Pflanzenabwehr höchst vielfältig sind. Sie reichen von direkter Attacke eines Pathogens über die Erkennung spezifischer P/MAMPs bis hin zur feinen Regulierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche im HR münden können (van der Hoorn und Jones, 2004).

## 1.7 Die Rolle von Peroxidasen in der Pflanzenabwehr

Die Freisetzung von ROS während des oxidativen *Burst* stellt eine der schnellsten und wichtigsten Abwehrreaktionen der pflanzlichen Immunantwort dar (Apel und Hirt, 2004; Torres, 2010). Der Ursprung der ROS wird auf zwei Hauptquellen zurückgeführt: membranständige NADPH-Oxidasen und apoplastische- sowie Zellwand-assoziierte Peroxidasen (POX) (Bolwell *et al.*, 1998; Bolwell *et al.*, 2002; Bindschedler *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006; Torres, 2010).

Die Radikalbildung von NADPH-Oxidasen basiert auf der Reduktion molekularen Sauerstoffs ( $O_2$ ) zu Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), wobei der Übergang eines Elektrons von NADPH auf  $O_2$  katalysiert wird (Apel und Hirt, 2004). Das Radikal wirkt nur schwach oxidierend und verfügt über eine relativ kurze Halbwertszeit ( $t_{1/2} < 1$  sec.) (Kasai und McLeod, 1977; Florence, 1990; Sutherland, 1991). Daher erfolgt die spontane oder durch Superoxid-Dismutasen katalysierte Dismutation des Superoxidanions, welche zur Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) führt.  $H_2O_2$  ist membranpermeabel und

hat eine bedeutend längere Halbwertszeit (mehrere Sekunden) als  $O_2^{\bullet-}$  (Sutherland, 1991). Es wirkt zum einen als *second messenger*, in höheren Konzentrationen jedoch ist es toxisch. Daher wird die  $H_2O_2$ -Konzentration von verschiedenen Enzymen gesteuert (Apel und Hirt, 2004; Rhee *et al.*, 2005). So katalysieren z.B. Katalasen die Dismutation von  $H_2O_2$  zu Wasser ( $H_2O$ ) und  $O_2$ . Des Weiteren katalysieren Häm-Peroxidasen eine analoge Reaktion, bei der  $H_2O_2$  durch ein Reduktionsmittel zu  $H_2O$  reduziert wird (Baker und Orlandi, 1995). Als *Reduktionsäquivalent können hier neben Säuren, wie z.B. Ascorbinsäure oder Indol-3-Essigsäure (indole-3-acetic acid, IAA), auch phenolische und endolische Substrate dienen*. Diese werden durch Dehydrierung zu Lignin und Suberin umgesetzt, was als Lignifizierung bzw. *Suberinisierung* bezeichnet wird (Lamb und Dixon, 1997; Ogawa *et al.*, 1997; Chen und Schopfer, 1999).

Häm-Peroxidasen umfassen drei Klassen. Nur die Klassen I und III kommen in Pflanzen vor, Klasse-II-Peroxidasen dagegen liegen ausschließlich in Pilzen vor (Zamocky *et al.*, 2010). Ein Beispiel für eine sekretierte ins Xylem von Reispflanzen (*Oryza sativa*) sekretierte Klasse-III-Häm-Peroxidase ist PO-C1. Diese wird während des durch *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ausgelösten Bakterienbrandes aktiviert und akkumuliert im infizierten Gewebe. Hier kommt es zur Lignifizierung der Zellwände, was zu sekundärem Dickenwachstum führt und somit der Infektion entgegenwirkt (Hilaire *et al.*, 2001).

Für Klasse-III-Häm-Peroxidasen konnte neben der radikalabbauenden Funktion noch eine weitere katalytische Aktivität, die sogenannte Oxidase-Aktivität, gezeigt werden. Diese führt durch Reduktion von  $O_2$  zu Superoxid und  $H_2O_2$  zur Radikalbildung. Dies geschieht unter Verbrauch reduzierender Substrate, wie z.B. NADH oder Dihydroxyfumarat (Lamb und Dixon, 1997; Chen und Schopfer, 1999; Bolwell *et al.*, 2002; Almagro *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten *in vitro* Studien an der Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) die Bildung von Hydroxyl-Radikalen ( $^{\bullet}OH$ ) durch Reduktion von  $H_2O_2$  (Bolwell *et al.*, 1995; Chen und Schopfer, 1999).

Einige Studien belegen sogar, dass die Induktion des oxidativen *Burst* entscheidend von der Peroxidase-Aktivität abhängt. So zeigten transgene *Arabidopsis thaliana* Linien, in welchen die Häm-Peroxidase FBP1 *gesilenced* wurde, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber pilzlichen sowie bakteriellen Pathogenen. Auch war der durch PAMP-Zugabe ausgelöste oxidative *Burst* signifikant reduziert (Blee *et al.*,

2001; Bindschedler *et al.*, 2006). Analog führte Virus-induziertes-Gen-*silencing* der Paprika-Peroxidase CaPO2 zu gesteigerter Suszeptibilität von Paprika (*Capsicum annuum*) gegenüber *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Zudem waren oxidativer *Burst* und PCD signifikant reduziert (Choi *et al.*, 2007). Die Überexpression von CaPO2 in *A. thaliana* vermittelte gegenüber einer *Pseudomonas syringae* Infektion eine um den Faktor 10 gesteigerte Resistenz. Interessanterweise wurde in beiden Systemen durch Zugabe spezifisch wirkender Inhibitoren, wie Diphenyleniodonium (DPI) (NADPH-Oxidase-Inhibitor) oder KCN (Kaliumcyanid) (Peroxidase-Inhibitor), die direkte Abhängigkeit der Induktion des oxidativen *Burst* von der CaPO2-Aktivität gezeigt. Außerdem war in stabil transformierten *A. thaliana* Linien eine NADPH-Oxidase unabhängige ROS-Produktion zu beobachten (Choi *et al.*, 2007).

Des Weiteren gibt es Beispiele von Peroxidasen, welche essentiell für die Ausbildung biotropher Interaktionen während der Nodulation (Salzwedel und Dazzo, 1993; Cook *et al.*, 1995; Mathesius, 2001) oder Mykorrhizierung sind (Spanu und Bonfantefasolo, 1988; Günther *et al.*, 1998; Tarvainen *et al.*, 2004; Fester und Hause, 2005).

Außerdem spielen POX neben den beschriebenen Funktionen im Rahmen von Pflanzen/Mikroorganismen-Interaktionen Schlüsselrollen in allen Wachstumsphasen von Pflanzen (Passardi *et al.*, 2005). Die Funktionen pflanzlicher Peroxidasen sind demnach sehr vielfältig und noch nicht vollständig aufgeklärt.

## 1.8 Aufgabenstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte das sekretierte *U. maydis* Effektorprotein Pep1 (*Protein essential during penetration 1*) bezüglich seiner biologischen Funktion charakterisiert werden. Basierend auf der Aminosäuresequenz von Pep1 waren keine Rückschlüsse auf die Funktion des Effektors möglich. Daher sollten komplementäre Ansätze zu einer funktionellen Charakterisierung dieses Effektors führen. Durch Mutationen möglicherweise für die Funktion des Effektors wichtiger Aminosäuren sowie Trunkierungen des N- und C-Terminus von Pep1, sollten funktionelle Regionen des Proteins identifiziert werden. Außerdem sollte der Effektor heterolog

in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Danach sollten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden, pflanzliche Interaktionspartner identifiziert werden. Weiterhin sollte die Rolle der möglichen Interaktion während Pflanzenabwehr näher untersucht werden, um Rückschlüsse auf die biologische Funktion von Pep1 ziehen zu können.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Sequenz-Analyse von Pep1 Homologen

Pep1 ist zwischen *U. maydis* und *U. hordei* stark konserviert (Doehlemann *et al.*, 2009). Ein Sequenzvergleich zwischen vier Pep1-Orthologen aus *U. maydis*, *U. hordei*, *S. reilianum* und *S. scitamineum* bestätigt diese artübergreifende Konservierung des Effektors (Abb. 8). Die relative Ähnlichkeit von Pep1 zwischen diesen vier Spezies ist > 60 %.



**Abbildung 8: Sequenzvergleich von Pep1 aus *U. maydis*, *U. hordei*, *S. reilianum* und *S. scitamineum*.** Grüner Rahmen: Signalpeptid-Regionen der Pep1 Homologe. Roter Rahmen: Glycin-reiche Region von Pep1 basierend auf der Analyse von Doehlemann *et al.* 2009. Schwarze Rahmen: Vier konservierte Cysteine die möglicherweise Disulfidbrücken bilden (vgl. 2.6). Identische Bereiche sind orange hinterlegt. Die relativen Ähnlichkeiten, ausgehend vom UmPep1, der Vollängenproteine sowie der hochkonservierten Regionen (AS42-136 (•••••)) und der Glycin-reichen Regionen (AS141-178 (— —)), stehen rechts (Sequenzvergleich mittels „Sequence Assembly“/FastScan Method, Clonemanager 9.0).

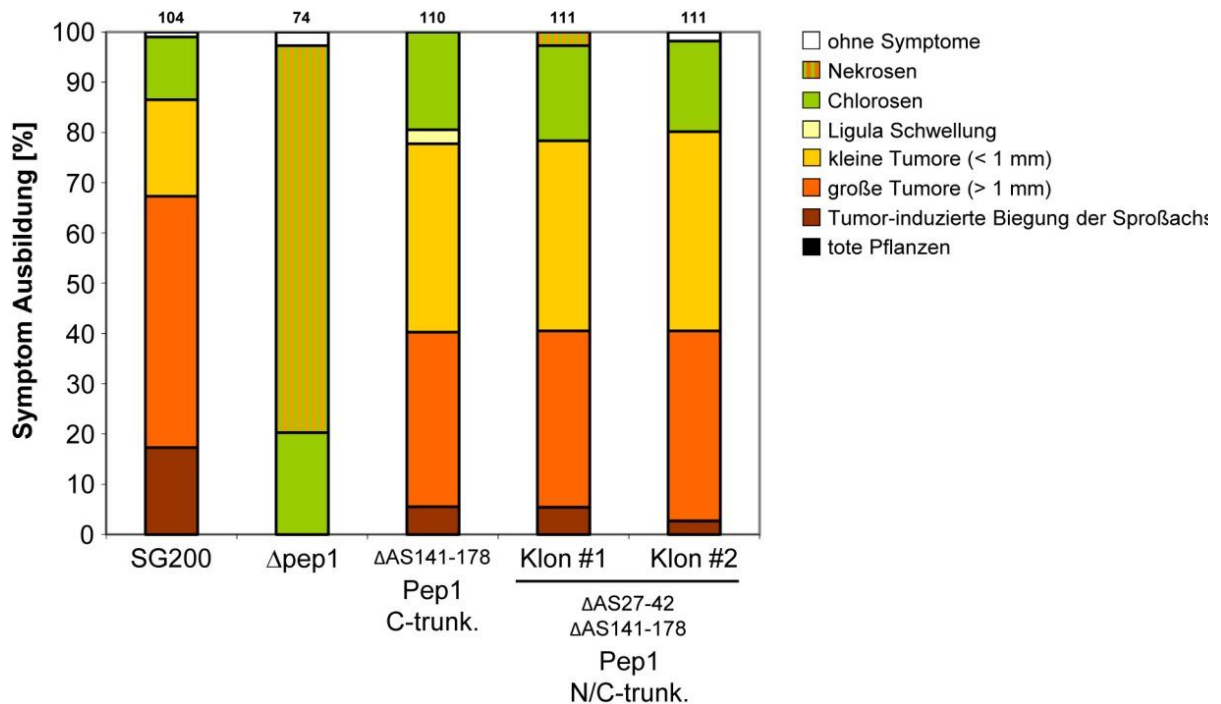
Die Sequenzhomologien zwischen den hochkonservierten Bereichen sind > 74 %. Der Konservierungsgrad der Glycin-reichen Regionen variiert relativ stark. Ausgehend von *U. maydis* Pep1 ist dieser im Vergleich zu *U. hordei* und *S. scitamineum*-Pep1 < 48%, beträgt aber gegenüber *S. reilianum*-Pep1 65 %. Der grundsätzliche Aufbau des Effektors ist in allen vier Brandpilzarten gleich und umfasst ein N-terminales Signalpeptid, eine hochkonservierte Kernregion, vier konservierte Cysteine sowie einen nicht konservierten Glycin-reichen Bereich.

### 2.2 Die N- und C-terminalen Trunkierungen von Pep1

Doehlemann *et al.* (2009) zeigten, dass die Deletion der Glycin-reichen Region (AS 141-178), des nicht konservierten C-terminalen Bereichs von Pep1 keine Auswirkungen auf die *U. maydis* Pathogenität hat. Um den funktionellen Bereich von Pep1 einzugrenzen, wurde ein weiterer, nicht konservierter Abschnitt, welcher sich dem Signalpeptid anschließt, trunkiert (AS 27-41). Diese trunkierte Pep1-



Version wurde N-terminal mit dem nativen Signalpeptid fusioniert und in die Pep1-Deletionsmutante transformiert. Nach Bestätigung der Einzelintegration im *ip*-Lokus mittels Southern Blot wurden zwei Klone bezüglich ihrer Virulenz untersucht (Abb. 9).



**Abbildung 9: N- und C-terminale Pep1 Trunkierungen führen zu einem geringen Pathogenitätsverlust.** Virulenzanalyse der Stämme *U. maydis* SG200, SG200Δpep1(Δpep1), SG200Δpep1-pep1<sup>ΔAS141-178</sup> (ΔAS141-178, Pep1 C-trunk.), sowie zweier Klone des Stammes SG200Δpep1-pep1<sup>ΔAS27-42,ΔAS141-178</sup> (ΔAS27-42,ΔAS141-178, Pep1 N/C-trunk.). Zwölf Tage nach Infektion wurden die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen quantifiziert. Die Krankheitssymptome der einzelnen Pflanzen wurden nach Kämper et al. (2006) je nach Stärke in verschiedene Kategorien eingeteilt. Die Legende für die Klassifizierung der verschiedenen Symptome ist rechts gezeigt. Alle Komplementations-Stämme tragen eine einfache Integration des Komplementationskonstruktes im *ip*-Lokus. Die Abkürzungen der verschiedenen Stammbezeichnungen stehen in Klammern. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist über den Graphen angegeben. Die Deletion der C-terminalen AS 27-42 von Pep1, welche zusätzlich zu den AS 141-178 deletiert wurden, führt zu keinem weiteren Virulenzverlust.

Der Stamm SG200Δpep1-pep1<sup>ΔAS141-178</sup> (ΔAS141-178, Pep1 C-trunk.) zeigt einen geringen Pathogenitätsverlust. Dies weicht von der durch Doehlemann et al. (2009) gezeigten Beobachtung ab. Interessant ist jedoch, dass die neu eingeführte N-terminale Pep1 Trunkierung zu keiner weiteren Abnahme der Pathogenität führt.

### 2.3 Heterologe Überexpression und Aufreinigung von Pep1

Als Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung von Pep1 mittels biochemischer Methoden wurde das Protein heterolog in *E. coli* überexprimiert und anschließend aufgereinigt. Im Verlauf der Arbeiten zur Pep1-Aufreinigung zeigten sich zwei Hauptprobleme. Zum einen war nach der Überexpression nur sehr wenig Protein in löslicher Form zugänglich. Zum anderen zeigte sich, dass Pep1 bei Anreicherung zur Präzipitation neigt. Ein Hydropathie-Plot nach Abraham und Leo (1987) verdeutlicht die Hydrophobizität des Proteins (siehe Anhang Abb. 31). Lösliches Pep1 konnte im Verlauf der Arbeiten nur bis zu einer Konzentration von ca. 1 mg/ml angereichert werden.

### 2.4 Optimierung der IPTG-induzierten Überexpression in *E. coli*

Um eine größtmögliche Konzentration von löslichem Pep1 zu erhalten, wurden Parameter wie die IPTG-Konzentration, Antibiotikakonzentrationen, Glucosekonzentration, Inkubationstemperaturen der ÜN-Vorkulturen bzw. der Hauptkulturen sowie die Inkubationszeiten variiert.

Initial wurde versucht, Pep1 durch die N-terminale Fusion mit einem His<sub>6</sub>-tag über die Ni-NTA Methode aufzureinigen. Wie eingangs bereits beschrieben, neigt Pep1 jedoch zur Präzipitation. Der genannte Schwellenwert von ~1 mg/ml löslichen Proteins konnte, auch unter Verwendung verschiedener (Hochsalz-)Puffer, nicht überschritten werden.

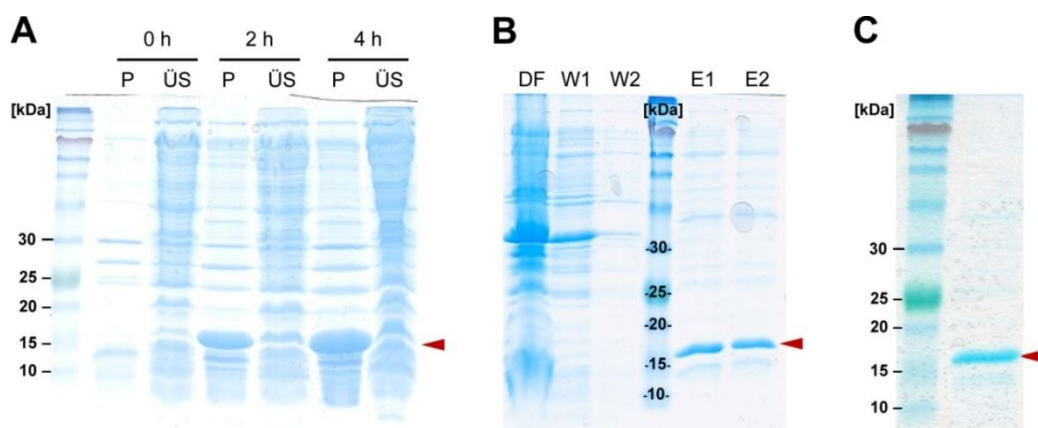
Daher wurde getestet, ob sich die Löslichkeit von Pep1 durch Trunkierungen des Effektors verbessern ließ. Die Trunkierungen beinhalteten dabei die nicht konservierten Bereiche des Proteins (vgl. Abb. 8). Diese Regionen sind, aufgrund des hohen Gehalts unpolarer AS, relativ hydrophob. Außerdem weist der Pep1-C-Terminus laut SMART-Vorhersage relativ große unstrukturierte Bereiche auf. So umfasste die Trunkierung des C-terminalen Glycin-reichen Bereichs von Pep1 (AS 141-178), die Region, deren Deletion keinen bzw. einen nur geringen Pathogenitätsverlust zur Folge hatte (Doehlemann *et al.*, 2009). Zudem wurde eine N-terminale Trunkierung eingeführt (AS 1-42), da die Deletion dieser Region ebenfalls keinen Pathogenitätsverlust zur Folge hatte (vgl. Abb. 9). Allerdings

konnte durch die Einführung der verschiedenen Trunkierungen die Löslichkeit des Proteins nicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Parallel wurde versucht, die Löslichkeit von Pep1 durch Fusion an größere, gut lösliche tags zu verbessern (Tab. 1). Die Fusion an das Maltose-Binde-Protein (MBP) führte zu einer Verbesserung der Löslichkeit um den Faktor 2. Allerdings zeigte sich in *in vitro* Assays, dass das Fusionsprotein nicht funktionell war. Erfolgte die Abspaltung des tags, so präzipitierte Pep1 und lag in Lösung mit nie mehr als ~1 mg/ml vor (Daten nicht gezeigt).

tag-Bezeichnung	Fusionsprotein [kDa]	N/C-terminale Trunkierung	Abspaltung möglich mit	Löslichkeit verbessert
GST (Glutathion S-Transferase)	37,4	ja	Prescission Protease	nein
CBD (Chitin-Binde-Domäne)	39,4	ja	/	nein
MBP (Maltose-Binde-Protein)	58,9	/	Prescission Protease	ja

**Tabelle 1: Getestete tags zur Verbesserung der Löslichkeit von Pep1.** Um die Löslichkeit von Pep1 zu verbessern, wurden drei Pep1-Fusionen mit verschiedenen tags getestet, welche selbst eine sehr gute Löslichkeit aufweisen. Zusätzlich wurde Pep1 bei Fusionen an GST und CBD-tag N- und C-terminal trunziert (N-terminal:  $\Delta$ AS1-42, C-terminal:  $\Delta$ AS141-178). Allerdings führte lediglich die Fusion an MBP zu einer verbesserten Löslichkeit ( $c_{\text{MBP-Pep1}} \sim 2 \text{ mg/ml}$ ).

Da alle Versuche, die Ausbeute an löslichem funktionellen Pep1 zu steigern, fehlschlagen, wurde für Pep1 die Ni-NTA Methode optimiert und ein standardisiertes Aufreinigungs-Protokoll etabliert. Ein Überexpressionstest sowie die verschiedenen Schritte einer typischen His-Pep1 Ni-NTA-Aufreinigung sind exemplarisch in Abbildung 10 dargestellt.



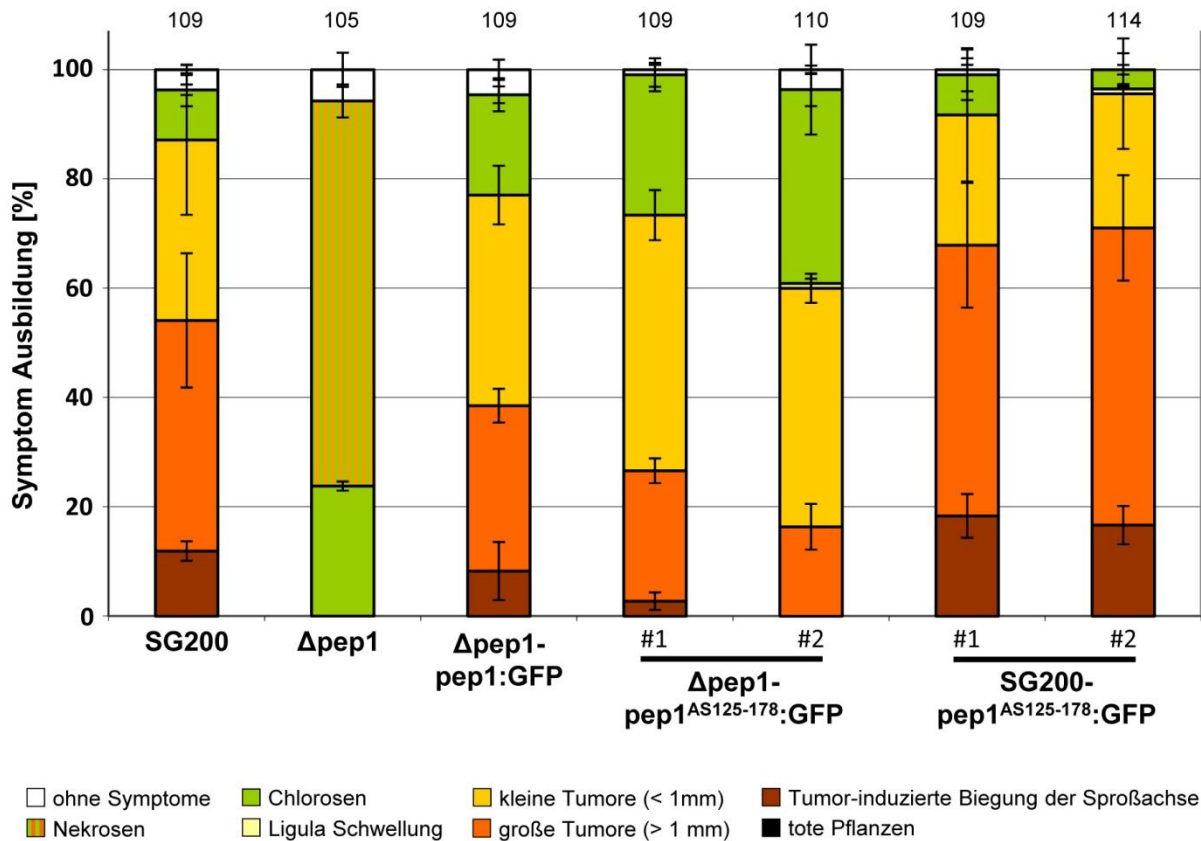
**Abbildung 10: Heterologe Überexpression und typische Ni-NTA Aufreinigung von Pep1.** Die Laufhöhe des 18,5 kDa großen His-Pep1 ist durch rote Pfeile markiert. **(A)** IPTG-induzierte, heterologe Überexpression von Pep1 in *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS über einen Zeitraum von 4 h. Eine Akkumulation des überexprimierten Proteins in der löslichen Fraktion ist nicht erkennbar. P: (unlösliche) Pellet-Fraktion, ÜS: (löslicher) Überstand. **(B)** Verschiedene Aufreinigungsschritte von Pep1 während der Ni-NTA Aufreinigung. DF: Durchfluss, W: Waschschrte, E: Elutionsschritte. **(C)** Vereinigte und konzentrierte Eluate von Pep1 nach standardisierter Ni-NTA Aufreinigung.

Deutlich zu erkennen ist die Akkumulation von Pep1 in der unlöslichen Pellet-Fraktion (P). Eine Anreicherung von Pep1 in der löslichen Fraktion (ÜS) ist nicht zu erkennen (Abb. 10 A). Dennoch gelang es, Pep1 mittels der Ni-NTA-Methode aufzureinigen und bis zu einer Konzentration von ~ 1 mg/ml zu konzentrieren (Abb. 10 B, C). Anschließend wurde das Protein in einen gewünschten Puffer umgepuffert und mit 10 % Glycerol versetzt, bei -20°C gelagert.

## 2.5 Die Rolle des Pep1 C-Terminus für die *U. maydis* Virulenz

Die Deletion der Pep1-Aminosäuren 141-178 scheint keine (Doehlemann *et al.*, 2009) oder nur eine sehr geringe Rolle bei der Virulenzvermittlung von *U. maydis* gegenüber der Wirtspflanze Mais zu spielen (vgl. Abb. 9). Dennoch zeigen alle bekannten Pep1-Sequenzen eine Anreicherung von Glycin-Resten im C-Terminus des Effektors (Abb. 8). Um zu verifizieren, ob dieser Teil des Proteins eine Rolle für die Virulenz von *U. maydis* spielt, wurde ein Komplementationskonstrukt erstellt, in welchem die AS 27-124 deletiert wurden. Die verbleibende Sequenz kodiert für das N-terminale Sekretionssignal, und den Glycin-reichen C-Terminus, der im Vergleich zur in Doehlemann *et al.*, (2009) hergestellten Deletion um 16 weitere AS erweitert wurde, um einen vorgelagerten Glycin/Serin-reichen Abschnitt von AS 125-140 einzubinden. Zur Lokalisierung des trunkierten Proteins wurde zudem eine C-terminale GFP Fusion erstellt.

Das Konstrukt wurde unter der Kontrolle des nativen Promotors mit dem Signalpeptid fusioniert und in den *ip*-Lokus der *U. maydis* Stämme SG200 und SG200 $\Delta$ pep1 inseriert. Die daraus resultierenden Stämme SG200-pep1<sup>AS125-140</sup>-GFP und SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>AS125-140</sup>-GFP wurden anschließend bezüglich ihrer Pathogenität untersucht. Interessanterweise führte die Insertion der Komplementationskonstrukte zur partiellen Restauration der Pathogenität im SG200 $\Delta$ pep1-Hintergrund (Abb. 11). Die Insertion im SG200-Hintergrund führte zu keinem signifikanten Anstieg der Pathogenität.

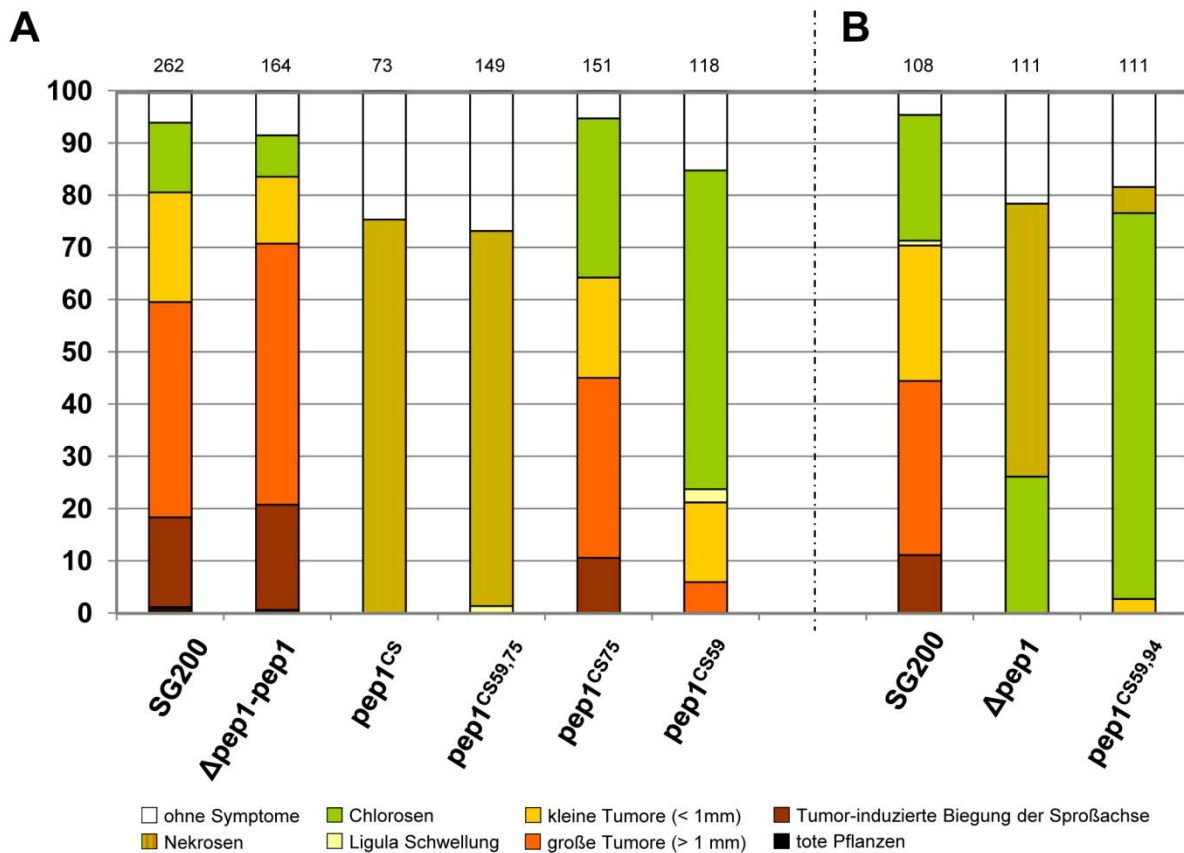


**Abbildung 11: Der Pep1 C-Terminus vermittelt eine unerwartete Virulenz.** Virulenzanalyse der Stämme *U. maydis* SG200, SG200 $\Delta$ pep1 ( $\Delta$ pep1), SG200 $\Delta$ pep1-pep1:GFP ( $\Delta$ pep1-pep1:GFP), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>AS125-178</sup>:GFP ( $\Delta$ pep1-pep1<sup>AS125-178</sup>:GFP), SG200-pep1<sup>AS125-178</sup>:GFP (SG200-pep1<sup>AS125-178</sup>:GFP). Die Abkürzungen der verschiedenen Stammbezeichnungen stehen in Klammern. Die Quantifizierung der Krankheitssymptome erfolgte 12 Tage nach Infektion. Die Krankheitssymptome der infizierten Pflanzen wurden, wie in Abbildung 7 beschrieben, quantifiziert. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist über den Graphen angegeben. Die Legende für die Klassifizierung der verschiedenen Symptome ist unten gezeigt. Die Insertion des Komplementationskonstrukt führt zur partiellen Restauration der Virulenz der Pep1-Deletionsmutante. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

## 2.6 Die Bedeutung der vier konservierten Cysteine von Pep1

Pep1 enthält vier konservierte Cysteine, die essentiell für die Sekretion des Proteins aus *U. maydis* sind (Doehlemann *et al.*, 2009). Kombinationen verschiedener Einzel- und Mehrfach-Substitutionen der vier Cysteine durch Serin wiesen differenzierte Phänotypen auf der Pflanze auf (Doehlemann *et al.*, 2009). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen ausgebildet werden (Doehlemann *et al.*, 2009). Um abschließend herauszufinden zwischen welchen Cysteinresten die putative Disulfidbrückenbildung erfolgt, wurde eine weitere Substitution der Cysteine C59 und C94 durch Serin in Pep1 inseriert. Unter Kontrolle des nativen

Promotors wurde das Komplementationskonstrukt im  $\Delta pep1$ -Hintergrund im *ip*-Lokus inseriert. Der daraus resultierende Stamm SG200 $\Delta pep1$ -*pep1*<sup>CS59,94</sup> wurde anschließend bezüglich seiner Pathogenität untersucht (Abb. 12).

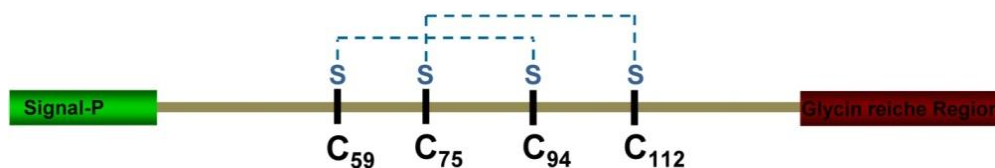


**Abbildung 12: Zusammenfassende Darstellung aller Virulenzanalysen der verschiedenen Cystein-mutierten *U. maydis* Stämme.** Alle Komplementations-Stämme tragen eine einfache Integration des Komplementationskonstruktes im *ip*-Lokus. Die Abkürzungen der verschiedenen Stammbezeichnungen stehen in Klammern. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist über den Graphen angegeben. Die Quantifizierung der Krankheitssymptome erfolgte 12 Tage nach Infektion. Die Legende für die Klassifizierung der verschiedenen Symptome ist unten gezeigt. **(A)** Virulenzanalyse der Stämme *U. maydis* SG200, SG200 $\Delta pep1$ -*pep1* ( $\Delta pep1$ -*pep1*), SG200 $\Delta pep1$ -*pep1*<sup>CS59</sup> (*pep1*<sup>CS59</sup>), SG200 $\Delta pep1$ -*pep1*<sup>CS75</sup> (*pep1*<sup>CS75</sup>), SG200 $\Delta pep1$ -*pep1*<sup>CS59,75</sup> (*pep1*<sup>CS59,75</sup>), SG200 $\Delta pep1$ -*pep1*<sup>CS59,75,94,112</sup> (*pep1*<sup>CS</sup>), (erstellt durch Doehlemann *et al.* (2009)) **(B)** Virulenzanalyse der Stämme *U. maydis* SG200, SG200 $\Delta pep1$  ( $\Delta pep1$ ), SG200 $\Delta pep1$ -*pep1*<sup>CS59,94</sup> (*pep1*<sup>CS59,94</sup>).

Die Auswertung aller Boniturdaten unter Einbeziehung der neu generierten Mutante zeigt eine deutliche Differenzierung der Phänotypen. Je nachdem, welches Cystein substituiert wird, zeigt sich entweder eine graduelle Abnahme der Virulenz oder aber ein vollständiger Verlust der Pathogenität, welcher nicht vom  $\Delta pep1$ -Phänotyp zu unterscheiden ist.

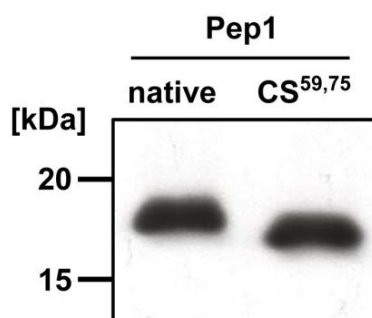
So zeigte sich, dass Einzelsubstitutionen immer eine graduelle Abnahme der Virulenz zur Folge hatten. Auch die Doppelsubstitution der Cysteine 59 und 94 führte lediglich zu einer verringerten Virulenz. Im Unterschied dazu, zeigten jedoch

die Doppelsubstitutionen der Cysteine 59 und 75 einen vollständigen Pathogenitätsverlust, genauso wie die Substitution aller vier Cysteine durch Serin. Aufgrund der signifikanten Unterschiede bezüglich der Pathogenität der verschiedenen Mutanten auf der Pflanze lässt sich ableiten, dass in der Struktur von Pep1 zwei sich überlappende Disulfidbrücken vorliegen (Abb. 13). Diese Struktur ergibt sich, wenn man den kompletten Verlust der Pathogenität, einhergehend mit dem typischen, nekrotischen  $\Delta pep1$  Phänotyp, auf den Verlust beider Disulfidbrücken zurückführt bzw. intermediäre Phänotypen als Verlust nur einer Disulfidbrücke interpretiert.



**Abbildung 13: Putatives Modell der Disulfidbrücken von Pep1.** Basierend auf den Boniturdaten der verschiedenen Cystein-mutierten *U. maydis* Stämme ergeben sich zwei sich überlappende Disulfidbrücken innerhalb von Pep1.

Basierend auf der Annahme von zwei sich überlappenden, intramolekularen Disulfidbrücken, wurde das Laufverhalten des mutierten Pep1 mit dem des nativen Pep1, im SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen, verglichen. Da unter diesen Bedingungen Disulfidbrücken intakt bleiben, kommt es zu keiner vollständigen Entfaltung der Proteinstruktur, was dazu führt, dass sich weniger SDS-Moleküle an das Protein anlagern. Aufgrund der veränderten Nettoladung, läuft ein komplett entfaltetes Protein somit schneller, als im unvollständig entfalteten Zustand. Aus den sich daraus ergebenden Unterschieden der Laufhöhe resultiert der zu beobachtende „Gel-Shift“ (Abb. 14).

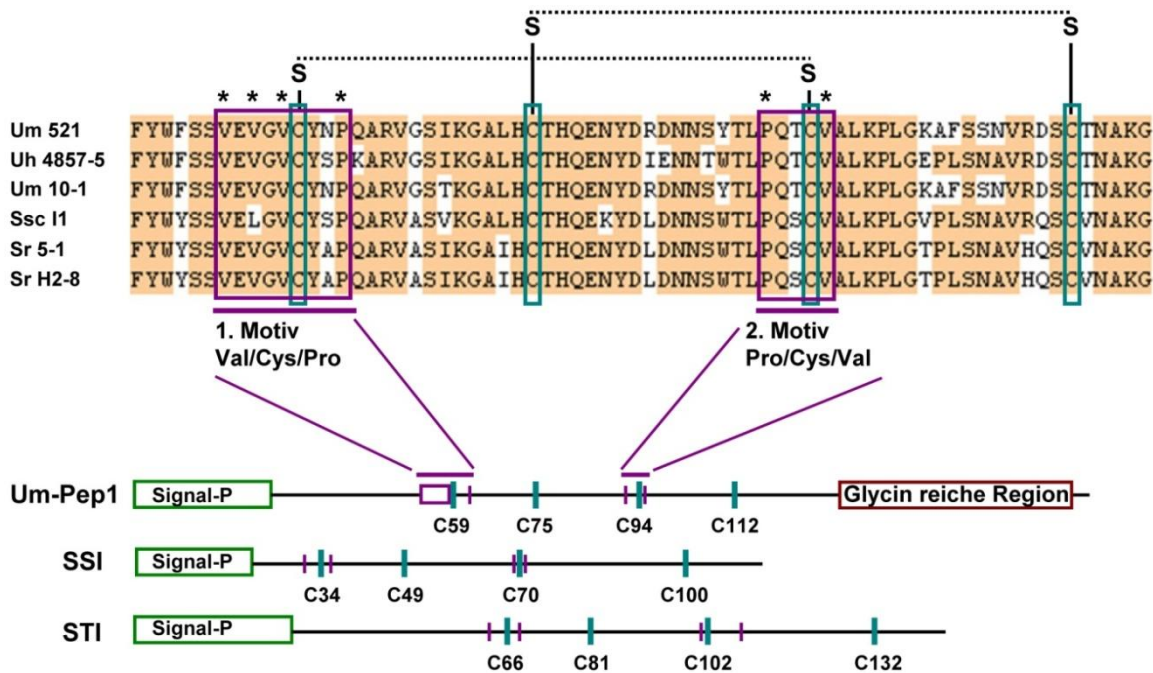


**Abbildung 14: Gelshift von Pep1 nach Deletion beider Disulfidbrücken im nicht reduzierenden SDS Gel.** Die Substitution der Cysteinreste C59 und C75 führt zu einem veränderten Laufverhalten von heterolog aufgereinigtem Pep1. Der mit anti-Pep1 Antikörpern erstellte Western Blot zeigt, dass mutiertes Pep1<sup>CS59,75</sup> schneller läuft als natives Protein.

Der Vergleich des Laufverhaltens unter nicht reduzierenden Bedingungen, von nativem Pep1 gegenüber mutiertem Pep1, zeigte den typischen Gel-Shift. Diese Beobachtung unterstützt das Modell der Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken des Effektors.

## 2.7 Identifizierung eines putativen Protease-Inhibitor-Motivs in Pep1

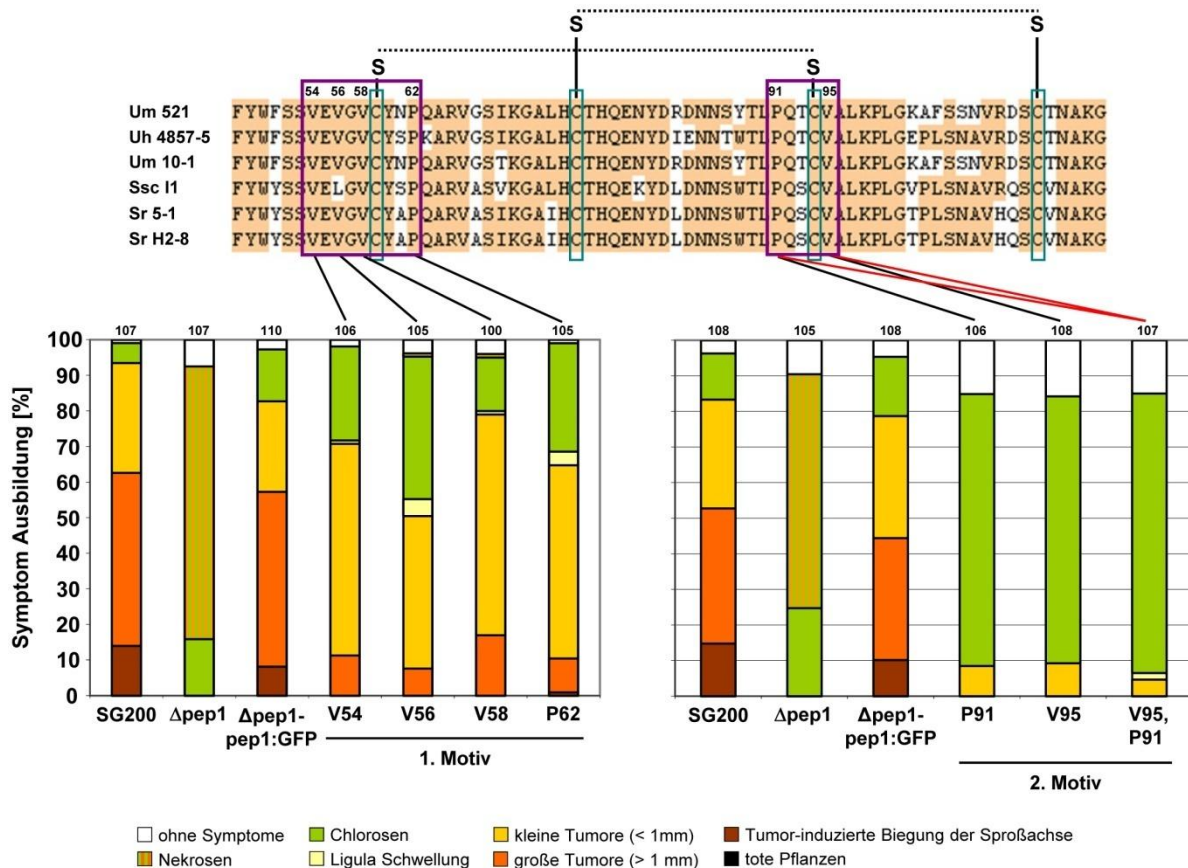
Wie bereits beschrieben, ist der zentrale Bereich von Pep1 zwischen verschiedenen Brandpilzen hoch konserviert. Innerhalb dieser konservierten Domäne befindet sich ein potentielles Protease-Inhibitor-Motiv (Abb. 15).



**Abbildung 15: Sequenzvergleich von Pep1 Varianten verschiedener *U. maydis* Isolate bzw. verwandter Brandpilzarten zeigt ein putatives Serine-Protease-Inhibitor-Motiv.** Lila Boxen/Balken: Basierend auf dem durch Strickler *et al.* (1992) publizierten Serinprotease-Inhibitor-Motiv für die Inhibitoren SSI und STI, wurde die Position des 1. Motivs, welches das erste konservierte Cystein umrahmt, hervorgehoben. Ein zweites, in der Publikation nicht erwähntes Motiv, welches jeweils das dritte Cystein umrahmt, wurde ebenfalls hervorgehoben. (\*): Aminosäuren welche durch Punktmutationen in Alanin substituiert wurden (Sequenzvergleich mittels „Sequence Assembly“/FastScan Method, Clonemanger 9.0).

Dieses ähnelt stark einem Konsensusmotiv der Serinprotease-Inhibitoren SSI (Streptomyces Subtilisin Inhibitor) und STI (Streptomyces Trypsin Inhibitor) und besteht aus einer Abfolge von Valin, Cystein und Prolin ( $V/X/C/X_{n \times 5}/P$ ) (Strickler *et al.*, 1992). Um zu untersuchen ob dieses potentielle Serinprotease-Inhibitormotiv für die Funktion von Pep1 eine Rolle spielt, wurde es mit einer Kombination verschiedener Einzel- und Mehrfach-Substitutionen adressiert. Dies geschah in enger Zusammenarbeit mit Sebastian Ziemann im Rahmen der Betreuung seiner Bachelorarbeit am MPI Marburg.



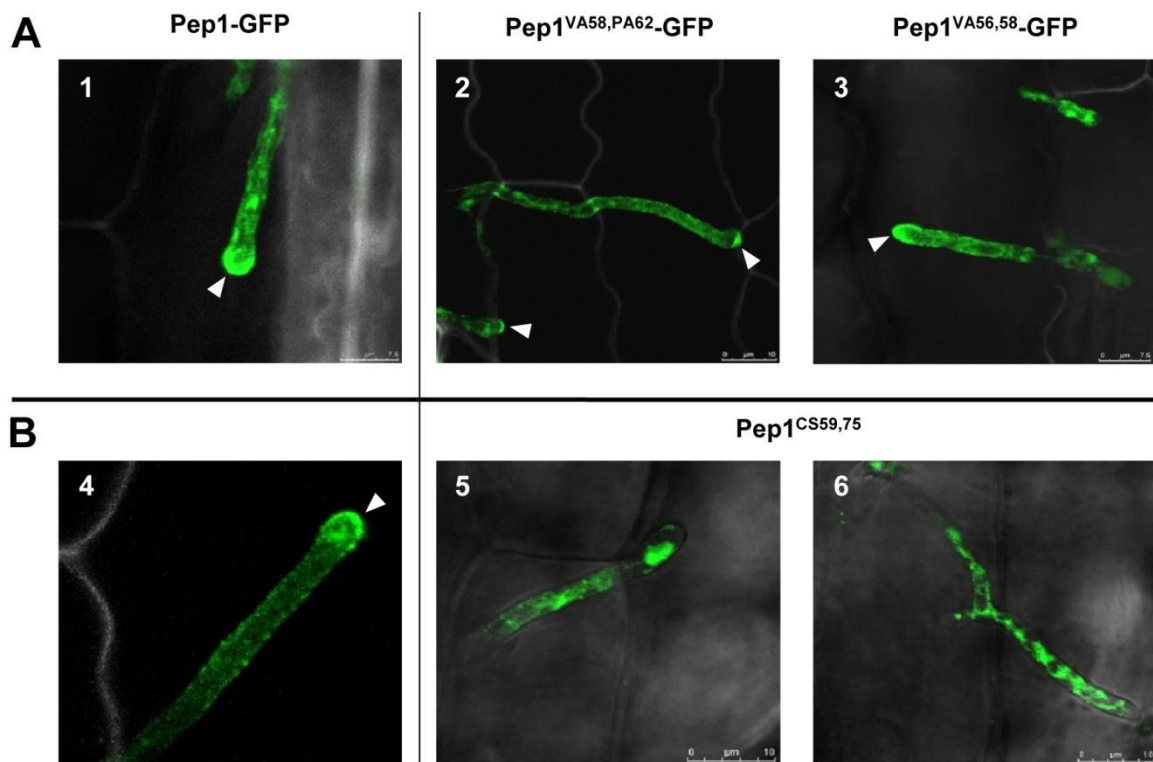


**Abbildung 16: Punktmutationen in den putativen Serinprotease-Inhibitormotiven von Pep1 führen zur Abnahme der Pathogenität.** Virulenzanalyse der Stämme *U. maydis* SG200, SG200 $\Delta$ pep1 ( $\Delta$ pep1), SG200 $\Delta$ pep1-pep1:GFP ( $\Delta$ pep1-pep1:GFP), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA54</sup>:GFP (V54), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA56</sup>:GFP (V56), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA58</sup>:GFP (V58), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>PA62</sup>:GFP (P62), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>PA91</sup>:GFP (P91), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA95</sup>:GFP (V95), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA56,PA91</sup>:GFP (V95, P91). Alle Komplementations-Stämme tragen eine einfache Integration des Komplementationskonstruktes im *ip*-Lokus. Die Abkürzungen der verschiedenen Stammbezeichnungen stehen in Klammern. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist über den Graphen angegeben. Die Quantifizierung der Krankheitssymptome erfolgte 12 Tage nach Infektion. Die Legende für die Klassifizierung der verschiedenen Symptome ist unten gezeigt. Bei allen Punktmutationen wurde durch Alanin substituiert. Alle Punktmutationen führen zu einer Abnahme der Pathogenität. Die Substitutionen von P91 und/oder V95 führen zum stärksten Pathogenitätsverlust.

Alle mutierten Pep1-Versionen wurden als Pep1-GFP-Fusion erstellt und in *U. maydis* SG200 $\Delta$ pep1 unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert. Mittels Southern Blot wurde die Einfach-Integration im *ip*-Lokus überprüft. Alle Substitutionen, sowohl im ersten als auch im zweiten Motiv, führen zu einer Abnahme der Pathogenität (Abb. 16). Im ersten Motiv führt die Substitution von V56 und P62 zum stärksten Virulenzverlust. Interessanterweise ist der Pathogenitätsverlust bei Substitutionen im zweiten putativen Serinprotease-Inhibitormotiv deutlich stärker. Hier führen bereits die Einzelsubstitutionen von V95 und P91 zu einem deutlichen Virulenzverlust (siehe Anhang Abb. 33). Die

Doppelsubstitution von V95 und P91 führt zu einem fast vollständigen Verlust der Pathogenität.

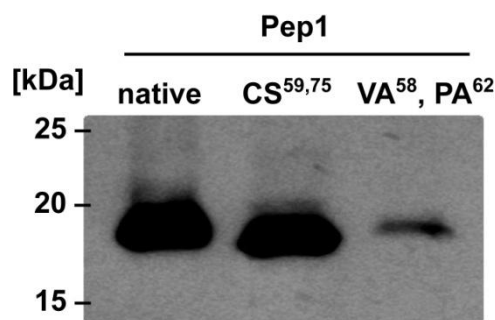
Doehlemann *et al.* (2009) zeigten, dass die Substitution der Cysteine C59 und C75 neben einem deutlichen Pathogenitätsverlust dazu führte, dass Pep1 nicht mehr in die biotrophe Interaktionszone sekretiert wird (Abb. 17 B). Da die beiden potentiellen Serinprotease-Inhibitor-motive die Cysteine C59 und C94 umrahmen, wurde überprüft, ob die in den potentiellen Motiven eingebrachten Substitutionen ebenfalls eine Störung der Pep1-Sekretion verursachen. Die mikroskopische Analyse der Doppelsubstitutions-Stämme SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA58,PA62</sup>-GFP und SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA56,58</sup>-GFP zeigt allerdings, dass, im Gegensatz zu den Cystein-mutierten Stämmen, die Ursache für die beobachtete Abnahme der Pathogenität nicht in einer gestörten Sekretion liegt.



**Abbildung 17: Sekretionsverhalten mutierter Pep1-GFP Fusionen.** Weiße Pfeile zeigen die Pep1-GFP Akkumulation an der Hyphenspitze (**A**) Intrazellulär wachsende Hyphen der Stämme SG200 $\Delta$ pep1-pep1-GFP (1), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA58,PA62</sup>-GFP (2) und SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA56,VA58</sup>-GFP (3). Die Bilder 2 und 3 zeigen die für Pep1 typische Lokalisation, bei welcher das Fusionsproteins die gesamte Hyphe umschließt und an der Hyphenspitze akkumuliert. Bild 2 zeigt zudem die Akkumulation an Zell-Zell-Passagen im Apoplasten der Pflanze. (**B**) Im Vergleich dazu sind die Lokalisationen von Pep1/Pep1<sup>CS59,75</sup>-GFP der Stämme SG200 $\Delta$ pep1-pep1-GFP (4) SG200  $\Delta$ pep1-pep1<sup>CS59,75</sup>-GFP (5, 6) abgebildet (Abbildung 5 und 6 aus Doehlemann *et al.* (2009)). Bild 4 zeigt die für Pep1-GFP typische Lokalisation. Im Gegensatz dazu erkennt man auf den Bildern 5 und 6, dass die eingebrachten Substitutionen von C59 und C75 dazu führen, dass Pep1 nicht mehr sekretiert wird. Cystein mutierte Pep1-GFP-Fusionen akkumulieren im Zytoplasma von *U. maydis*. (Abbildungen 1-4 erstellt in Kooperation mit Sebastian Ziemann)

Sowohl Pep1<sup>VA58,PA62</sup>-GFP als auch Pep1<sup>VA56,VA58</sup>-GFP zeigen die typische Pep1-GFP Lokalisierung. Gekennzeichnet ist diese durch das die Hyphe umschließende Signal des Fusionsproteins, die Akkumulation in Wuchsrichtung an der Hyphenspitze sowie die Akkumulation an Zell/Zell-Passagen im Apoplasten (Abb. 17, Bilder 2 & 3).

Western Blot Analysen bestätigen zudem, dass die Ausbildung der putativen Disulfidbrücken durch die Mutationen von V58 und P62 nicht beeinträchtigt werden, da das Laufverhalten im nicht reduzierenden SDS-Gel des mutierten Pep1<sup>VA58,PA62</sup> dem des nativen Pep1 entspricht (Abb. 18).



**Abbildung 18: Pep1<sup>VA58,PA62</sup> und natives Pep1 zeigen kein verändertes Laufverhalten im nicht reduzierenden SDS-Gel.** Der mit anti-Pep1 Antikörpern erstellte Western Blot zeigt, kein verändertes Laufverhalten von heterolog aufgereinigtem nativem Pep1 und Pep1<sup>VA58,PA62</sup>. Als Kontrolle wurde Cystein-mutiertes Pep1<sup>CS59,75</sup> mitgeführt, welches nach Deletion der putativen Disulfidbrücken ein verändertes Laufverhalten aufweist.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann man schließen, dass mit den Mutationen des ersten putaiven Serineprotease-Inhibitormotivs offenbar ein für die Funktion des Effektors essentieller Teil getroffen wurde.

## 2.8 Aktivitäts-basiertes Protein Profiling

Da Pep1 Ähnlichkeiten zu bekannten Serinprotease-Inhibitoren aufweist (vgl. 2.7), wurde der Effektor bezüglich seiner Funktion als möglicher Protease-Inhibitor analysiert. Dazu wurde das sogenannte „Aktivitäts-basierte Protein Profiling“ (ABPP) genutzt (van der Hoorn *et al.*, 2004). Die Methode basiert auf Sonden, welche durch kovalente Bindung eines spezifischen Inhibitors an ein Reportermolekül aktive Proteine wie z.B. Proteasen markieren. Die Reportermoleküle sind an biotinylierte oder fluoreszierende Reste, welche mittels Western Blot bzw. Fluoreszenzscans detektiert werden können, gekoppelt (Kaschani *et al.*, 2009b). Die Sensitivität der Methode erlaubt es, markierte Proteine im Hintergrund eines komplexen Proteoms zu detektieren (Kaschani *et al.*, 2009b). Typisch für jedes ABPP sind, je nach verwendeter Sonde, spezifische Detektionsmuster nach Auftrennung z.B. über ein SDS-Gel. Das Muster spiegelt

die Größen der verschiedenen aktiven Proteasen bzw. deren verschiedene Prozessierungsstufen wieder (van der Hoorn *et al.*, 2004).

Mikroarray-Analysen zeigten, dass während der Abwehrreaktion, im Rahmen der inkompatiblen Interaktion zwischen der Pep1-Deletionsmutante und Mais, der SA-Signalweg induziert wird (Doehlemann *et al.*, 2009). Damit potentielle Interaktionspartner von Pep1, welche in Abhängigkeit der SA-induzierten Abwehr aktiviert werden, im Blattextrakt vorliegen, wurde ein Teil der verwendeten Pflanzen mit SA infiltriert. Für das ABPP wurden somit Blattextrakte von unbehandelten, SG200-infizierten sowie mit SA-infiltrierten Pflanzen verwendet. Die verwendeten Sonden wurden freundlicher Weise von der AG van der Hoorn (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt.

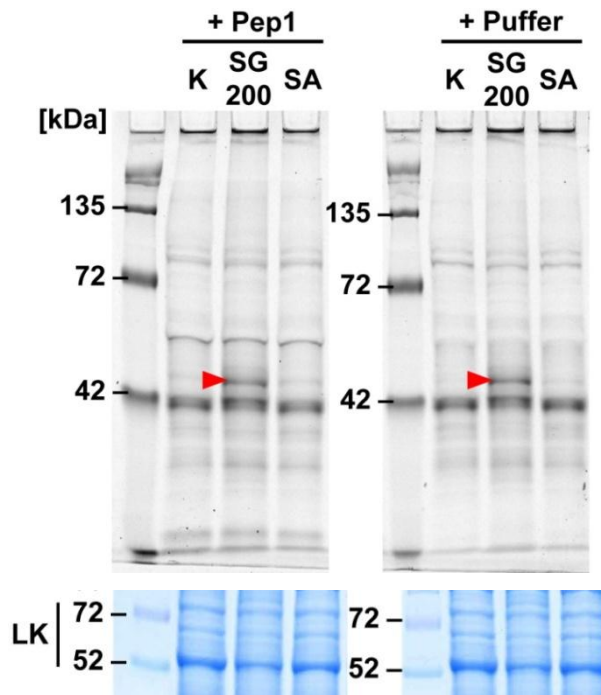
### **2.8.1 Aktivitäts-basiertes Protein *Profiling* auf putative Interaktionspartner von Pep1**

Um ein mögliche inhibitorische Wirkung von Pep1 auf Serinhydrolasen zu untersuchen, wurde ein ABPP mit der Sonde Fluorophosphonat-Rhodamin (FP-Rh) durchgeführt, welches aktive Serinhydrolasen fluoreszenz-markiert.

Dazu wurden Blattextrakte der unbehandelten, SG200-infizierten sowie SA-infiltrierten Maisblätter mit Pep1 coinkubiert und anschließend mit FP-Rh markiert. Durch Fluoreszenzscans wurden die Signale der FP-Rh-markierten Serinhydrolasen detektiert.

Dabei zeigte sich, dass Pep1 keine inhibitorische Wirkung auf Serinhydrolasen hat (Abb. 19). Der *Scan* zeigt zudem eine zusätzliche Bande um 50 kDa, in allen Proben denen Pep1 zugesetzt wurde, welche vermutlich ein unspezifisches Signal darstellt. Außerdem fällt eine zusätzliche Bande im *U. maydis* SG200-infiziertem Blattextrakt auf. Dies deutet auf die Anwesenheit von mindestens einer Serinhydrolase in Folge der *U. maydis*-Infektion hin. Unklar ist, ob es sich um eine *U. maydis*- oder eine Mais-Serinprotease handelt.

Da das ABPP mit FP-Rh zeigte, dass Pep1 keine inhibitorische Wirkung auf Serinhydrolasen hat, wurden weitere Klassen von Proteasen untersucht. Neben Serinproteasen wurde daher auch die inhibitorische Wirkung von Pep1 auf Proteasen der vacuolär prozessierenden Enzyme (VPE's) sowie auf das Proteasom untersucht.



**Abbildung 19: Pep1 inhibiert keine Mais-Serinhydrolasen.** Fluoreszenz-Scan von FP-Rh-markierten Serinhydrolasen verschiedener Mais-Blattextrakte. Der Scan zeigt, mittels SDS-Gel aufgetrennte Serinhydrolasen von nicht infizierten (K), mit *U. maydis* SG200 infizierten (SG200) und mit Salicylsäure-infiltrierten (SA) Mais-Blattextrakten. Die Pep1 Konzentration im Assay betrug 15  $\mu$ M. Es ist kein Verlust von Banden nach Pep1 Zugabe gegenüber der entsprechenden Pufferkontrolle sichtbar, was darauf schließen lässt, dass keine Serinhydrolase-Inhibition erfolgte. Rote Pfeile markieren eine zusätzliche Bande welche in Folge der Infektion mit SG200 auftritt. Als Ladekontrolle (LK) ist das mittels Coomassie-Blau gefärbte SDS-Gel abgebildet, welches die RuBisCo Lauffront zeigt.

Zur Fluoreszenz-Markierung der VPE's wurde die, für diese Proteaseklasse spezifische Sonde AMS101 verwendet (Johana Misas-Villamil und Renier v.d. Hoorn, MPIZ, Köln, pers. Mitteilung). Die Fluoreszenz-Markierung des Proteasoms erfolgte mittels der Proteasom-spezifischen Sonde MV151 (Verdoes *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2010). Das ABPP zeigte, dass Pep1 auf VPE- und proteasomale Aktivität keinen Einfluss hat (Daten nicht gezeigt).

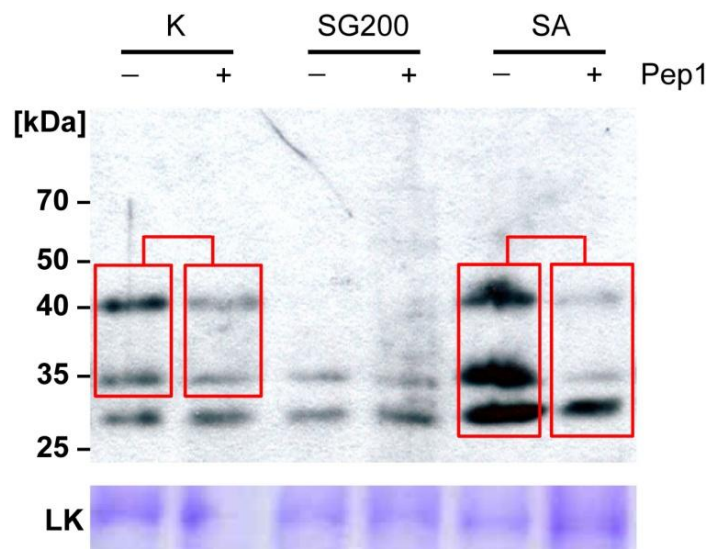
### 2.8.2 Pep1 inhibiert Papain-ähnliche Cysteinproteasen

Im ABPP zeigt Pep1 weder eine Wirkung auf Serinhydrolasen noch auch auf eine der anderen getesteten Proteasen. Daher wurde die Wirkung von Pep1 auf PLCP's, welche während der Pflanzenabwehr eine wichtige Rolle spielen (vgl. 1.6) (Konno *et al.*, 2004; Shindo und van der Hoorn, 2008) untersucht.

Das ABPP für PLCP's basiert auf der Sonde DCG-04, welche ein biotinyliertes Derivat des spezifischen Cysteinprotease-Inhibitors E-64 ist (van der Hoorn *et al.*, 2004; van der Hoorn und Kaiser, 2011). Die Signaldetektion erfolgt über die Western Blot basierte Visualisierung der biotinylierten Sonde. Die Pep1-Wirkung wurde, wie in den vorhergegangenen ABPP's, in Extrakt von unbehandelten, SG200-infizierten und SA-infiltrierten Maisblättern untersucht.

Interessanterweise zeigte sich, dass aufgrund der SA-Infiltration die Konzentration aktiver PLCP's, im Vergleich zu unbehandelten Blättern, stark ansteigt (Abb. 20). Im Gegensatz dazu nimmt die PLCP-Konzentration in SG200-infiziertem Extrakt stark ab. Aktive PLCP's auf Höhe von 40 kDa sind in SG200-infiziertem Blattextrakt nicht mehr nachweisbar.

Außerdem war zu beobachten, dass durch Pep1-Zugabe die Aktivität der PLCP's inhibiert wurde. Nach Pep1-Zugabe ist im unbehandelten Kontrollextrakt eine Abnahme der Signalintensität, der Banden zwischen 35 und 40 kDa zu beobachten. Trotz der erhöhten PLCP-Konzentration werden PLCP's auf dieser Laufhöhe auch im SA-infiltrierten Blattextrakt nahezu vollständig durch Pep1 inhibiert. Auch die Signalintensität der Bande um 28 kDa, welche im Kontrollextrakt durch Pep1 nicht beeinflusst wird, nimmt im SA-infiltrierten Extrakt durch Pep1-Zugabe ab.



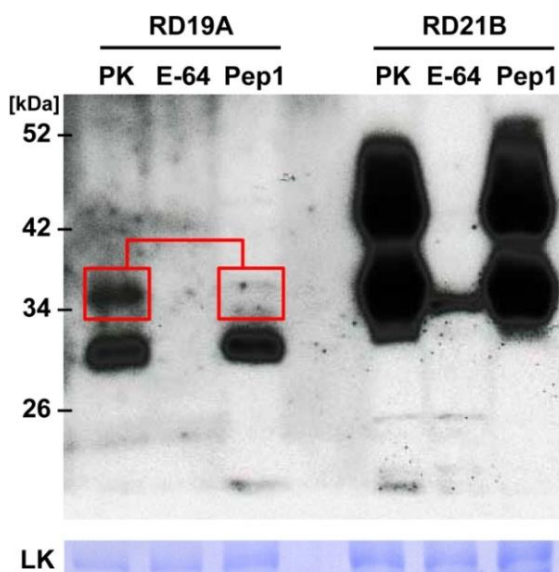
**Abbildung 20: Pep1 inhibiert Papain-ähnliche Cysteinproteasen (PLCP's) in Mais-Blattextrakten.** Der Western Blot zeigt DCG-04 Markierungen von PLCP's von nicht infiziertem (K), mit *U. maydis* SG200 infiziertem (SG200) und mit Salicylsäure-infiltrierten (SA) Mais-Blattextrakten. (Rote Boxen) Änderungen der Signalintensität des DCG-04-Sondensignals sind hervorgehoben. Die Pep1-Konzentration im Assay betrug 15  $\mu$ M. Als Ladekontrolle (LK) ist die, mittels Coomassie-Blau gefärbte, RuBisCo Lauffront abgebildet. Nach Pep1-Zugabe nehmen die DCG-04-Sondensignale im nicht infizierten Blattextrakt (K) auf der Höhe von 35 und 40 kDa leicht ab. Eine Abnahme des Sondensignals ist auch im mit SA-infiltrierten Blattextrakt (SA) sichtbar. Hier ist die relative Abnahme im Vergleich zum starken Ausgangssignal ohne Pep1-Zugabe wesentlich stärker. Auch nimmt die Signalintensität nach Pep1-Zugabe um 27 kDa ab. Die Intensität des schwachen Signals in den mit SG200-infizierten Proben kann durch Pep1-Zugabe nicht reduziert werden.

Die Ergebnisse des ABPP zeigen zum einen, dass durch SA-Infiltration die Konzentration aktiver PLCP's in Blattextrakt ansteigt und dass Pep1 die Aktivität dieser SA-induzierten PLCP's effektiv hemmt.

### 2.8.3 Pep1 inhibiert die *A. thaliana* Cysteinprotease RD19A

Die DCG-04-Markierungsexperimente zeigten, dass Pep1 PLCP's inhibiert. Um zu überprüfen, ob der Effektor gleichermaßen inhibierend auf alle PLCP's wirkt oder ob es Spezifität gegenüber einer oder mehreren PLCP's gibt, wurde die Wirkung von Pep1 auf verschiedene PLCP's getestet. Dazu wurden fünf *A. thaliana* PLCP's ausgewählt: RDL2, RD21B, THI1, SLCatB1 und RD19A. Diese Auswahl wurde getroffen, da bis auf RDL2 und RD21B, alle Proteasen jeweils verschiedenen PLCP-Unterfamilien angehören. RD21B unterscheidet sich strukturell von RDL2 durch das Vorhandensein einer C-terminalen Granulindomäne, welche während der Aktivierung der Protease abgespalten wird (van der Hoorn *et al.*, 2004). Zur Durchführung der Experimente wurden mir *N. benthamiana*-Extrakte, in welchem die entsprechenden PLCP's mittels *Agrobacterium tumefaciens*-Infektion überexprimiert wurden (van der Hoorn, nicht publiziert) von der AG van der Hoorn (MPIZ, Köln) zur Verfügung gestellt.

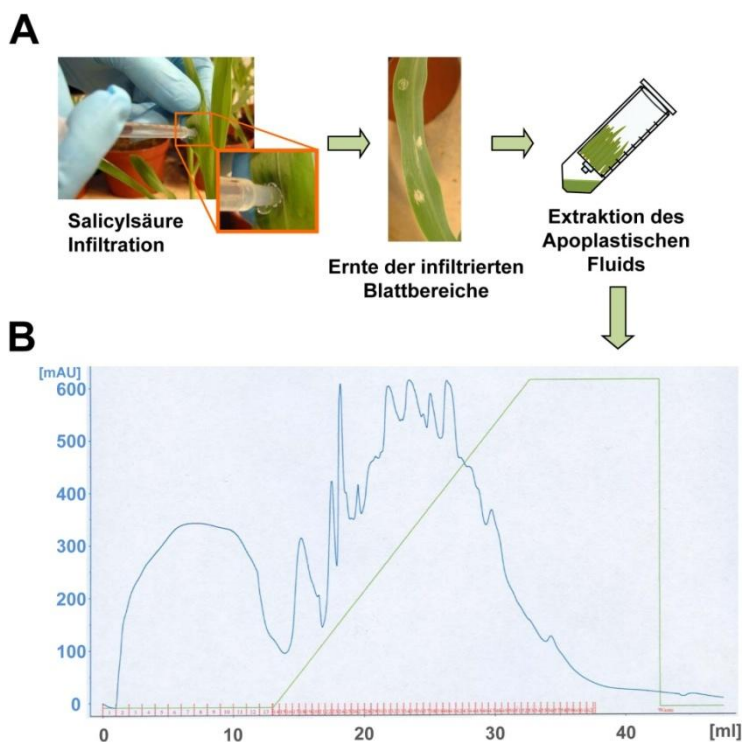
Die Inhibition der fünf PLCP's durch Pep1 wurde mittels ABPP, unter Verwendung der DCG-04-Sonde, überprüft. Es zeigte sich, dass weder RD21B, noch die drei anderen ausgewählten Arabidopsis PLCP's durch Pep1 inhibiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde eine Prozessierungsform von RD19A durch Pep1 inhibiert werden (Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass Pep1 spezifisch nur auf bestimmte PLCP's inhibierend wirkt.



**Abbildung 21: Pep1 inhibiert eine Prozessierungsform der *A. thaliana* Cysteinprotease RD19A.** Die in *N. benthamiana* überexprimierten *A. thaliana* Cysteinproteasen RD19A und RD21B zeigen entsprechend verschiedener Aktivierungsstufen des Enzyms ein typisches Muster in DCG-04 Markierungsexperimenten. Die Pufferkontrolle (PK) für RD19A weist Signale zweier aktiver Prozessierungsstufen auf. Die Zugabe von E-64 führt zum vollständigen Verlust des DCG-04-Signals. Pep1-Zugabe führt zur partiellen Inhibition nur einer der zwei Prozessierungsstufen von RD19A. RD21B wird nur durch E-64, nicht aber durch Pep1 inhibiert. Als Ladekontrolle (LK) ist die, mittels Coomassie-Blau gefärbte, RuBisCo Lauffront abgebildet.

## 2.9 Pep1 hemmt apoplastische Mais-Cysteinproteasen

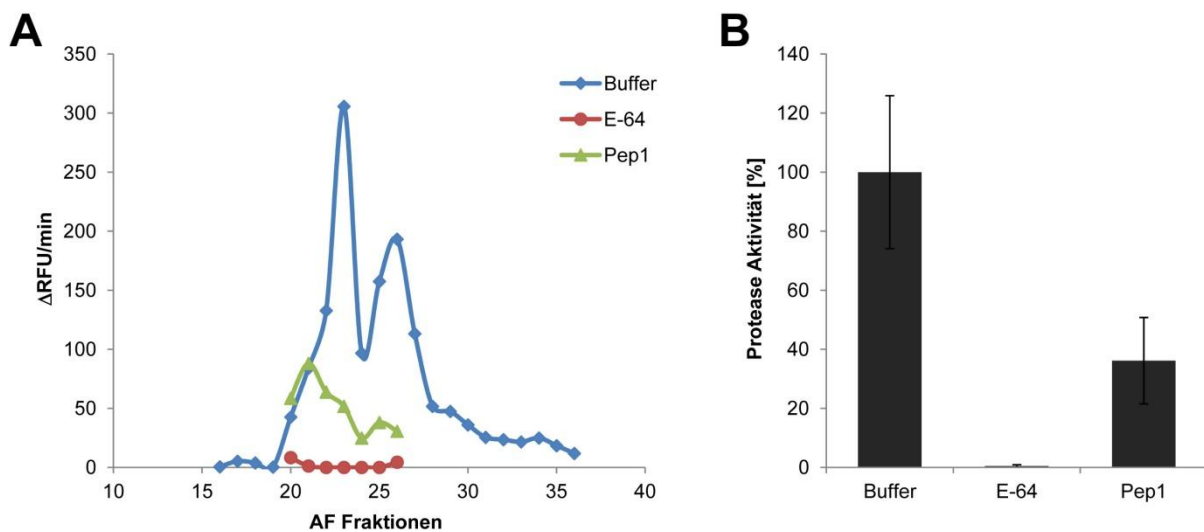
Während der Infektion wird Pep1 in die biotrophe Interaktionszone zwischen Pflanzenzelle und Pilzhyphe sekretiert (Doehlemann *et al.*, 2009), welche eine Erweiterung des pflanzlichen Apoplasten darstellt. Da die Ergebnisse des ABPP darauf hinweisen, dass Pep1 PLCP's inhibiert, wurde getestet, ob der Effektor inhibierend auf apoplastische Cysteinproteasen wirkt. Dazu wurde apoplastisches Fluid (AF) aus mit SA-infiltrierten Maisblättern extrahiert und mittels Anionen-Austausch-Chromatographie fraktioniert (Abb. 22). In mindestens acht dieser Fraktionen wurde eine hohe Cysteinprotease-Aktivität gemessen. Anschließend wurde untersucht, ob Pep1 in den betreffenden Fraktionen inhibierend auf Cysteinproteasen wirkt.



**Abbildung 22: Präparation von apoplastischem Fluid (AF) mit anschließender Fraktionierung mittels Anionen-Austausch-Chromatographie. (A)** 7 Tage alte Maispflanzen wurden mit SA infiltriert. Nach 2 Tagen wurden die infiltrierten Blattabschnitte geerntet und das AF extrahiert. **(B)** Dargestellt ist ein typisches Chromatogramm nach Fraktionierung des AF mittels Anionen-Austausch-Chromatographie. Die blaue Linie bildet das UV-Absorptionsspektrum ab, welches mit der Proteinkonzentration korreliert. Die grüne Linie zeigt den Konzentrationsverlauf des NaCl-Gradienten. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Fraktionierungsschritte abgebildet. Die Experimente wurden in Kooperation mit André Müller und Karina van der Linde durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass Pep1 Cysteinproteasen inhibiert (Abb. 23 A). Zudem war zu beobachten, dass Pep1 die verschiedenen AF-Fractionen nicht gleichermaßen effektiv hemmt. Im Mittel aus zwei biologischen Replikaten führte die Zugabe von 15  $\mu$ M Pep1, zu den betrachteten aktiven Fraktionen des AF, zu einer Abnahme der Proteaseaktivität um ca. 65 % (Abb. 23 B). Die Inhibition der proteolytisch aktivsten Fraktion #23 war, mit einer Hemmung um ca. 85 %, am effektivsten.





**Abbildung 23: Pep1 inhibiert Cysteinprotease-Aktivität in apoplastischem Fluid (AF).** Die Konzentration des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 betrug 5  $\mu$ M. Pep1 wurde mit 15  $\mu$ M eingesetzt. **(A)** Exemplarisch ist der Datensatz eines der zwei existierenden biologischen Replikate abgebildet. Die durch Anionen-Austausch-Chromatographie erhaltenen Fraktionen des AFs zeigen die höchste Cysteinprotease-Aktivität zwischen den Fraktionen 22 bis 26. E-64-Zugabe führte zur nahezu vollständigen Inhibition der Cysteinprotease-Aktivität. Die Zugabe von Pep1 führte zur partiellen Inhibition. **(B)** Mittlere Hemmung der Cysteinprotease-Aktivität in den AF-Fraktionen 22-26 durch Zugabe von Pep1 bzw. E-64 (Graph repräsentiert zwei biologische Replikate). Die Experimente wurden in Kooperation mit A. Müller und K. v. d. Linde durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Da die beiden biologischen Replikate eine relativ große Varianz aufwiesen, bedarf es mindestens einer weiteren Wiederholung des Experimentes.

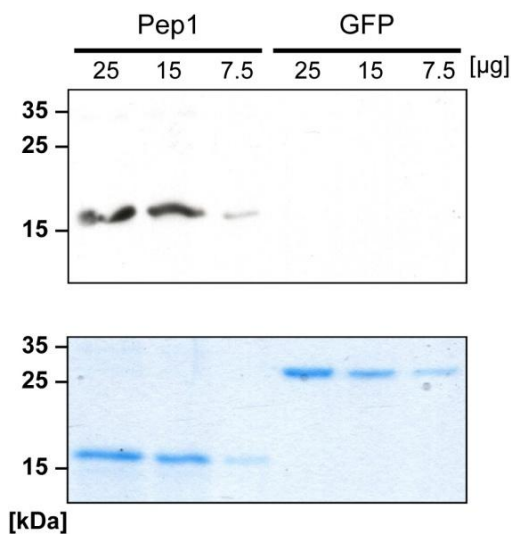
## 2.10 Pep1 interagiert mit der *Horseradish*-Peroxidase und inhibiert Peroxidase-Aktivität

Parallel zu den Versuchen zur Protease-Inhibition wurde untersucht, ob und wenn ja wie Pep1 zur Unterdrückung von Zelltod in der Pflanze nach *U. maydis* Infektion beiträgt. In Zusammenarbeit mit Christoph Hemetsberger wurde daher untersucht, ob Pep1 den oxidativen *Burst*, welcher eine initiale Abwehrmaßnahme der Pflanze nach PAMP-Erkennung darstellt, unterdrückt. Interessanterweise zeigt sich dabei, dass Pep1 nicht nur den, mittels des PAMP's Chitosan induzierten, oxidativen *Burst* von Mais inhibiert, sondern auch in der Lage ist, die *Horseradish*-Peroxidase (HRP) Aktivität zu inhibieren (Abb. 24).



**Abbildung 24: Pep1 inhibiert HRP-Aktivität *in vitro*.** Mittels Diaminobenzidin (DAB) Färbung wurde der Abbau von  $H_2O_2$  durch die HRP *in vitro* visualisiert. Der Radikalabbau führt zur Bildung dunkler Präzipitate, was zu einem Farbumschlag von farblos nach braun führt. Die Zugabe von 15  $\mu M$  Pep1 führt zur Inhibition dieser Farbreaktion.

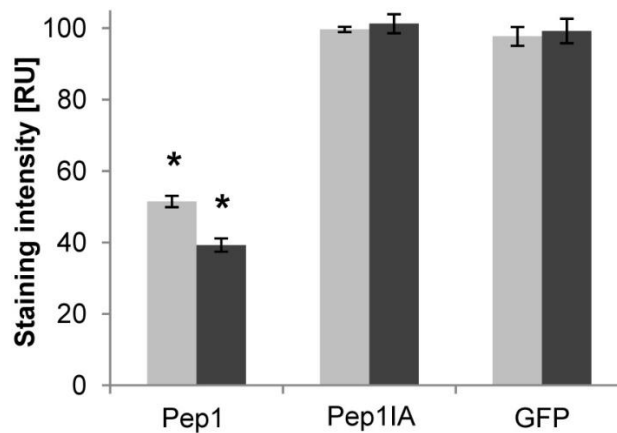
Um zu klären, ob Pep1 direkt mit der HRP interagiert, wurde ein *Far-Western* Blot Experiment durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Mengen von Pep1 auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und anschließend mit HRP inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden gleiche Mengen von rekombinant hergestelltem GFP auf dieselbe Membran geblottet. Spezifische Chemilumineszenz-Signale zeigten, dass HRP an Pep1 bindet (Abb. 25). Außerdem korrelieren die Intensitäten der Chemilumineszenz-Signale mit den Mengen des geblotteten Pep1, was die Spezifität der Bindung bestätigt.



**Abbildung 25: Im *Far-Western* Blot bindet HRP an Pep1.** Der *Far-Western* Blot zeigt die physische Interaktion von HRP und Pep1 (18,5 kDa), nicht jedoch von HRP und GFP (29,8 kDa) (oberes Feld). Als Ladekontrolle wurde ein separates, mit gleichen Proteinmengen beladenes Gel mit Coomassie-Blau gefärbt (unteres Feld).

Vor dem Hintergrund, dass Pep1 im Apoplasten lokalisiert (Doehlemann et al. 2009), wurde die Hypothese aufgestellt, dass Pep1 eventuell die ROS-Bildung verhindert, indem es die Aktivität apoplastischer Peroxidasen inhibiert. Um den Einfluss von Pep1 auf apoplastische Peroxidasen zu untersuchen, wurde AF aus Early Golden Bantam Mais isoliert. Das extrahierte Fluid wurde dann mittels DAB-Färbung auf Peroxidase-Aktivität getestet. Das AF zeigt eine Peroxidase-Aktivität, welche durch Zugabe von nativem Pep1 konzentrationsabhängig gehemmt werden konnte (Abb. 26). Hemmungen durch höhere Pep1-Konzentrationen

konnten in diesem Assay nicht untersucht werden, da das Assayvolumen die Pep1-Zugabe limitierte.



**Abbildung 26: Pep1 inhibiert die Peroxidase-Aktivität in apoplastischem Fluid (AF) aus Mais.** Mittels DAB-Färbung wurde die Peroxidase-Aktivität in AF visualisiert. Um mögliche inhibitorische Effekte zu zeigen, wurden heterolog aufgereinigte Proteine in zwei Konzentrationen eingesetzt: 10 µM (hellgrau) und 15 µM (dunkelgrau). Es zeigte sich, dass die Peroxidase-Aktivität durch Pep1 konzentrationsabhängig signifikant gehemmt wird. Durch kochen, denaturiertes Pep1 (Pep1IA) sowie GFP führten zu keiner Inhibition der Peroxidase-Aktivität. Die Pufferkontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. \*,  $P \leq 0,05$ .

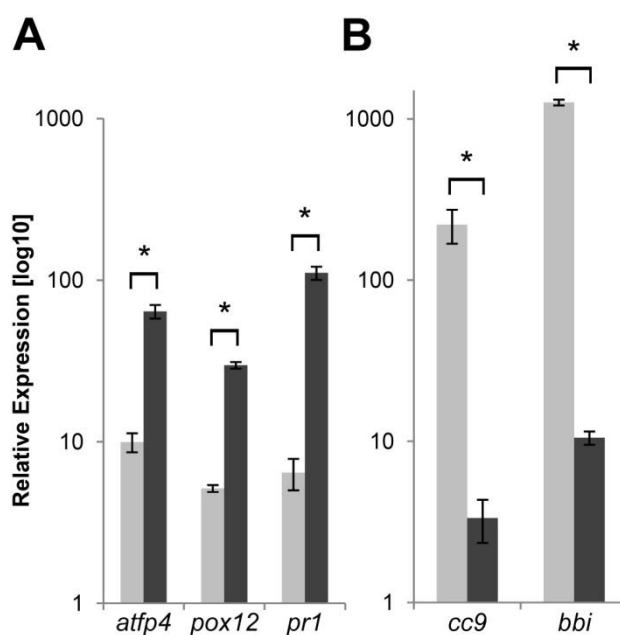
Da Pep1 sowohl die HRP als auch apoplastische Mais-Peroxidasen inhibiert deutet darauf hin, dass die Pep1-Peroxidase-Interaktion einen eher unspezifischen Charakter trägt.

## 2.11 Die Mais-Peroxidase-12 wird während der Infektion mit den *U. maydis*-Stämmen SG200 gegenüber SG200Δpep1 differentiell reguliert

Mikroarray-Analysen zeigten eine starke Aktivierung von Abwehr-assoziierten Genen der Wirtspflanze Mais nach SG200Δpep1-Infektion (Doehlemann *et al.*, 2009). Um ein differenzierteres Bild der transkriptionellen Regulation der Maisgene bezüglich der spezifischen Reaktionen gegenüber einer *U. maydis* SG200 beziehungsweise einer SG200Δpep1-Infektion zu erhalten, wurden die Expressionslevel typischer Jasmonsäure- (JA) bzw. Salicylsäure-assoziiierter Markergene mittels qRT-PCR bestimmt. Als JA Markergene dienten der „Bowman Birk Trypsin Inhibitor“ (BBI, (Doehlemann *et al.*, 2008b)) sowie das „Cystatin-9“ (CC9, (Solomon *et al.*, 1999)) aus Mais. Beide Gene sind während der Infektion mit SG200 stark induziert, wohingegen sie während einer SG200Δpep1-Infektion

nur schwach exprimiert werden (Abb. 27 B). Im Gegensatz dazu sind SA-Markergene, wie das „Pflanzen-Resistenz-Gen 1“ (PR1, (Seo *et al.*, 2001)) und das SA-induzierte Metall-Bindeprotein „*Arabidopsis thaliana* farnesylated protein“ (ATFP4 (Metwally *et al.*, 2003; Taj *et al.*, 2010; Rivas-San Vicente und Plasencia, 2011)), spezifisch nach SG200 $\Delta$ pep1-Infektion induziert.

Vor dem Hintergrund der HRP-Inhibition durch Pep1 war allerdings die Regulation eines Genes, welches die Peroxidase-12 (POX12) kodiert, höchst interessant, da *pox12* nach SG200 $\Delta$ pep1-Infektion, nicht jedoch nach SG200-Infektion, stark induziert wird (Abb. 27 A) (Doehlemann *et al.*, 2009).

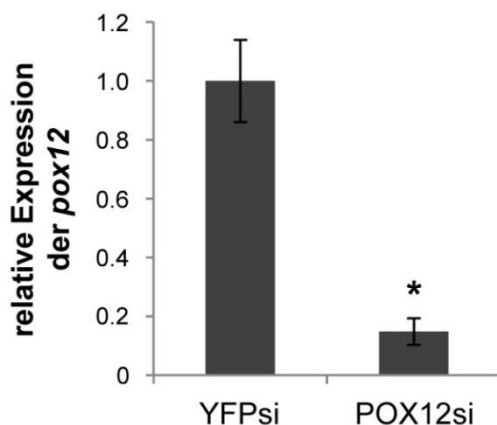


**Abbildung 27: JA/SA assoziierte Mais-Marker-Gene werden als Antwort auf die Infektion mit den *U. maydis* Stämmen SG200 gegenüber SG200 $\Delta$ pep1 differentiell reguliert.** Die Expressions-Level von JA/SA-Marker Genen wurde mittels real-time qRT-PCR analysiert. Die untersuchten Blattproben stammten von Mock, SG200 und  $\Delta$ pep1- infizierten Pflanzen welche zwei Tage nach Infektion analysiert wurden. Die Expressionslevel Mock-infizierter Pflanzen wurden auf 1 gesetzt. Anhand dieser Werte wurden die relativen Expressionen der verschiedenen Markergene für SG200 (hellgrau) und  $\Delta$ pep1 (dunkel-grau) infizierter Proben berechnet. **(A)** Die SA-Markergene *atfp4*, *pox12* und *pr1* sind als Antwort auf die  $\Delta$ pep1-Infektion induziert. **(B)** Im Kontrast dazu sind JA-Marker Gene, wie *cc9* und *bbi*, während der  $\Delta$ pep1-Infektion nicht induziert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. \*,  $P \leq 0,05$ .

Zu bemerken ist, dass beide, HRP und POX12, den sogenannten Klasse-III-Peroxidasen (NCBI: cd00693) der pflanzlichen Häm-Peroxidasen Superfamilie angehören. Sie weisen ca. 37 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene auf und sind in Bereichen des aktiven Zentrums hochkonserviert (siehe Anhang Abb. 33). Peroxidasen dieser Klasse wurden bereits in Zusammenhang mit pflanzlichen Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen untersucht und ihre Rolle bezüglich der ROS-Produktion während der initialen Phase des oxidativen *Burst* detailliert untersucht (Lamb und Dixon, 1997; Kawano, 2003; Almagro *et al.*, 2009).

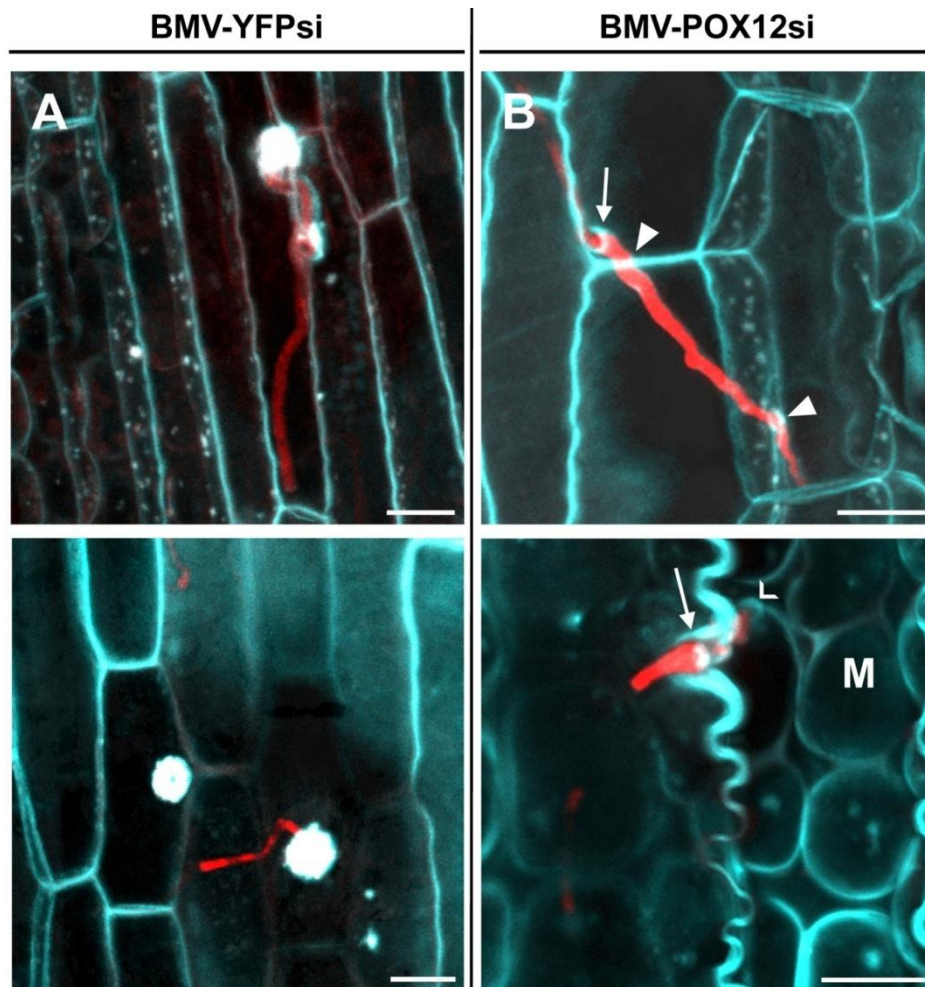
## 2.12 Das *silencing* der Mais-Peroxidase-12 führt zur partiellen Virulenz-Restauration der Pep1-Deletionsmutante

Um zu testen, ob die Funktion der ZmPOX12 für die *U. maydis*-Interaktion von Bedeutung ist, wurde *pox12* gesilencend. Dazu wurde das auf dem *Brome mosaic virus* (BMV)-basierende Virus-induzierte-silencing (VIGS)-System benutzt, welches das systemische *silencing* in Mais während der *U. maydis*-Interaktion ermöglicht (van der Linde *et al.*, 2011). Es wurden zwei Fragmente des kodierenden Bereichs von *pox12* in die RNA3 des BMV integriert (Details siehe Mat. & Meth. 4.3.4). Mais-Keimlinge wurden dann mit dem daraus resultierenden Konstrukt BMV-POX12si inokuliert und anschließend mit *U. maydis* infiziert. Kontrollpflanzen wurden mit einem BMV-silencing-Konstrukt des Nicht-Pflanzen-Gens *yfp* (*yellow fluorescent protein*; BMV-YFPsi) inokuliert, welches die *U. maydis*/Mais-Interaktion nicht beeinflusst (van der Linde *et al.*, 2011). BMV beimpfte Pflanzen wurden mit SG200 $\Delta$ pep1 infiziert. Das *Silencing* von *pox12* wurde mittels qRT-PCR verifiziert. Dabei zeigte sich, verglichen mit BMV-YFPsi geimpften Kontrollpflanzen, eine durchschnittliche Reduktion des *pox12*-Transkriptionslevels um 85 % in den mit BMV-POX12si beimpften Pflanzen (Abb. 28).



**Abbildung 28: qRT-PCR zur Bestimmung der *pox12* Silencing-Effizienz.** Die *pox12* Expressionslevel acht unabhängiger *pox12*si-Pflanzen (BMV/POX12si) sowie von sieben Kontrollpflanzen (BMV/YFPsi), wurden 48 h nach *U. maydis* SG200 $\Delta$ pep1-Infektion analysiert. Die durchschnittliche relative *pox12* Expression der BMV/YFPsi-Kontrollpflanzen wurde auf 1 gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. \*,  $P \leq 0,05$ .

Parallel zur qRT-PCR wurde, in Zusammenarbeit mit Christoph Hemetsberger, mittels konfokaler Mikroskopie die Effizienz der *U. maydis* SG200 $\Delta$ pep1-Infektion nach 48 h analysiert. Dabei zeigten BMV-YFPsi-Pflanzen, genau wie nicht behandelte Kontrollpflanzen, die Ausbildung großer Papillen an den SG200 $\Delta$ pep1-Infektionsstellen. Außerdem werden die Hyphen der Deletionsmutante kurz nach Epidermispenetration in ihrer Proliferation gestoppt (Abb. 29 B).



**Abbildung 29: Das Silencing der Peroxidase-12 unterdrückt die Mais-Penetrations-Resistenz gegenüber der  $\Delta pep1$ -Mutante. (A)** linke Spalte: Die Anilin-Blau-Färbung von Kontrollpflanzen (BMV-YFPsi) zeigt die Bildung großer Papillen an den SG200 $\Delta pep1$ -Penetrationsstellen. Direkt nach der SG200 $\Delta pep1$ -Penetration wird die Hyphenproliferation arretiert. **(B)** rechte Spalte: *pox12-silencing* Pflanzen (BMV-POX12si) welche mit SG200 $\Delta pep1$  infiziert wurden, zeigen erfolgreiche SG200 $\Delta pep1$ -Infektionen, gekennzeichnet durch Penetration der Epidermis (Pfeile), mehreren Zell/Zell-Passagen (Dreiecke), sowie dem Erreichen des tiefer gelegenen Mesophylls (M, Winkel). Dabei ist eine wesentlich verringerte Immunantwort seitens der Pflanze erkennbar. Balken: 10  $\mu$ m. (Mikroskopische Aufnahmen in Kooperation mit Ch. Hemetsberger).

Im Gegensatz dazu führt das *pox12-Silencing* zu einem erheblichen Anstieg der Penetrationseffizienz sowie einer signifikanten Reduktion sichtbarer Pflanzenabwehr (Abb. 29 A). Zudem können in den *pox12si*-Pflanzen häufig biotroph wachsende SG200 $\Delta pep1$ -Hyphen beobachtet werden. Diesen gelang, neben mehreren Zell/Zell-Passagen, auch eine Kolonisierung des Mesophylls (Abb. 29 A). Dieser Phänotyp konnte nie zuvor in Kontrollpflanzen, welche mit SG200 $\Delta pep1$  infiziert wurden, beobachtet werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist abzuleiten, dass die POX12-Aktivität zur Resistenz-Vermittlung von Mais gegenüber der  $\Delta pep1$ -Mutante beiträgt und dass die Inhibition dieser Peroxidase entscheidend während der *U. maydis*-Infektion ist.

## 3 Diskussion

### 3.1 Heterologe Expression von Pep1 in *Escherichia coli*

Zur Expression von Pep1 wurde *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS ausgewählt. Dieser Überexpressionsstamm verfügt über ein T7-Promotor-basiertes, IPTG-reguliertes Überexpressionssystem sowie zusätzliche tRNAs, die für fünf seltene Kodons kodieren. Da *U. maydis* eine ungewöhnliche Kodon-Nutzung aufweist, erschien dies sinnvoll um die Translationseffizienz zu steigern. Als wichtigstes Merkmal weisen die Rosetta-gami Stämme ein reduzierendes Milieu im Zytoplasma auf, was die Ausbildung und Stabilisierung möglicher Disulfidbrücken in Pep1 unterstützen sollte.

Dies konnte jedoch nicht verhindern, dass Pep1 oberhalb einer Konzentration von ~ 1 mg/ml präzipitierte. Dies ist vermutlich auf dessen hydrophoben Charakter zurückzuführen, was im Hydropathie-Blot nach Abraham und Leo (1987) deutlich wird. Ähnliche Probleme zeigten sich zuvor bereits für den *U. maydis* Effektor Stp1 (Schipper, 2009). Auch für Effektoren anderer Phytopathogene wurde eine schlechte Löslichkeit bei heterologen Aufreinigungsversuchen mit dem *E. coli*-System beobachtet (Takayuki Shindo, MPIZ, Köln, pers. Mitteilung). Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, dass Effektoren, z.B. weil sie hydrophobe Membranen überwinden müssen, ebenfalls einen hydrophoben Charakter aufweisen. Um die Löslichkeit von Pep1 zu verbessern, wurden unterschiedliche Tags getestet und N- bzw. C-terminale Trunkierungen von Pep1 vorgenommen. So gelang es, die Löslichkeit des Volllängen-Pep1, fusioniert an das Maltose-Binde-Protein, um den Faktor 2-3 zu steigern. Allerdings war das Fusionsprotein, vermutlich aufgrund des ca. 40 kDa großen MBP-Tags, in etablierten *in vitro* Assays nicht funktionell. Die Abspaltung des MBP-Tags nach Aufreinigung des Fusionsproteins führte dazu, dass ein Großteil von Pep1 präzipitierte. Auch die Variation anderer Parameter, wie pH-Wert, Salz-Komposition/Konzentration, Pufferart etc., führten zu keiner entscheidenden Verbesserung der Löslichkeit von Pep1. Mit dem etablierten Aufreinigungsprotokoll konnte somit lösliches Pep1 bis zu einer Konzentration von ~ 1 mg/ml hergestellt werden. Das Protein zeigte bis zu einer Lagerzeit von ca. 2 Monaten *in vitro* Aktivität.

### 3.2 Pep1 enthält zwei überlappende putative Disulfidbrücken

Viele sekretierte Effektoren, wie z.B. die Proteine Avr2 und Avr9 aus *C. vulvum* sowie Proteaseinhibitoren der Familien Epi (Extrazellulärer Proteaseinhibitor) und Epic (Proteaseinhibitoren mit Cystatin-ähnlicher Domäne), enthalten häufig eine gerade Anzahl von 4 bis 8 Cysteinen, welche durch Disulfidbrückenausbildung zur Stabilisierung der Proteinstruktur beitragen (Kooman-Gersmann *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2004; Thomma *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005; Misas-Villamil und van der Hoorn, 2008; de Jonge *et al.*, 2010). In allen bekannten Pep1-Sequenzen sind vier Cysteine konserviert (vgl. Abb. 8). Substitutionen der Cysteine C59 und C75 durch Serin führten dazu, dass heterolog aufgereinigtes mutiertes Pep1 im nicht reduzierenden SDS-Gel schneller lief als natives Pep1. Ein solch verändertes Laufverhalten lässt sich auf den Verlust der Disulfidbrücken zurückführen. Die dadurch entfaltete Proteinstruktur ermöglicht die Anlagerung von mehr SDS-Molekülen (Allore und Barber, 1984). In Folge der veränderten Nettoladung des Proteins läuft dieses im SDS-Gel schneller.

Des Weiteren führten Einzel- und Mehrfachsubstitutionen der vier Cysteine zu zwei charakteristischen Phänotypen auf der Pflanze: 1) Graduelle Abnahme der Pathogenität und 2)  $\Delta pep1$ -Phänotyp (typische nekrotische Läsionen) (Doehlemann *et al.*, 2009). Durch die von Doehlemann *et al.* (2009) gesetzten Substitutionen konnte bereits eines von drei möglichen Disulfidbrückenmodellen ausgeschlossen werden. Durch das Einbringen einer weiteren Substitutionsvariante war es möglich, das Modell der zwei sich überlappenden putativen Disulfidbrücken von Pep1 abzuleiten (vgl. 2.6). Unterstützt wird das Pep1-Disulfidbrückenmodell durch die Beobachtung, dass Cystein-mutiertes Pep1<sup>CS59,75</sup>, vermutlich aufgrund von Fehlfaltungen des Proteins, nicht sekretiert wird. Auch deutet die fleckige Lokalisierung auf eine Akkumulation im ER hin (vgl. Abb. 17) (Doehlemann *et al.*, 2009).

Ein typisches Disulfidbrückenmotiv vieler Protease-Inhibitoren ist der sogenannte Cystein-Knoten. Dieser besteht in der Regel aus drei Disulfidbrücken, welche durch Überlappungen dem Protein eine insgesamt kompakte und äußerst stabile Struktur verleihen (Pallaghy *et al.*, 1994; Arolas und Ventura, 2011). Die Disulfidbrücken der Effektoren Avr2 und Avr9 entsprechen ebenfalls dem des Cystein-Knotens. Avr2 enthält insgesamt vier Disulfidbrücken, wobei die drei



zentralen Brücken des Cystein-Knotens für die Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau verantwortlich sind. Die vierte Brücke vermittelt lediglich eine spezifische Konformation des C-Terminus, welche essentiell für die Funktion der Protease-Inhibitor-domäne ist (van't Klooster *et al.*, 2011). Für Avr9 konnte bisher kein Interaktionspartner identifiziert werden. Allerdings weist auch dieser Effektor große Homologien zu bekannten Proteaseinhibitoren auf (Kooman-Gersmann *et al.*, 1997).

Ein anderes Beispiel eines Effektors, welcher sich überlappende Disulfidbrücken ausbildet, ist Avr4. Dieser Effektor bindet an Chitin und maskiert dieses dadurch vor der PAMP-Erkennung durch die Pflanze. Zwar entsprechen die ausgebildeten Disulfidbrücken nicht dem Modell des Cystein-Knotens, vermitteln jedoch vergleichbare Eigenschaften. Ähnlich wie bei Avr2 schützen auch in Avr4 drei der vier Disulfidbrücken den Effektor vor proteolytischem Abbau, während die vierte Disulfidbrücke strukturgebend für die Chitinbindedomäne des Effektors ist (van den Burg *et al.*, 2004). Auch andere Inhibitoren, wie z.B. die Serinproteaseinhibitoren BPTI oder Aprotinin, weisen überlappende Disulfidbrückenmuster auf, welche ebenfalls Stabilität gegenüber Proteasen vermitteln (Arolas und Ventura, 2011; Zhirnov *et al.*, 2011).

Die zwei putativen Disulfidbrücken von Pep1 bilden auch eine sich überlappende Struktur und könnten somit Pep1 ebenfalls vor proteolytischem Abbau schützen. Um diese Hypothese zu prüfen, müssten Cystein-mutiertes sowie natives Pep1 proteolytisch aktiver Apoplastenflüssigkeit von Mais ausgesetzt werden. Sollten die Disulfidbrücken Pep1 vor proteolytischem Abbau schützen, müsste die Cystein-mutierte Variante schneller abgebaut werden als natives Protein. Die Abbauprodukte könnte man z.B. durch Verwendung hochprozentiger SDS-Gele sichtbar machen. Auch stehen für Pep1 zwei Antikörper zur Verfügung, welche jeweils ihre Epitope im konservierten bzw. im Glycin-reichen Bereich von Pep1 haben. Sofern die Epitope während des Abbaus nicht zerstört werden, wäre so eine Detektion von Spaltprodukten möglich. Weiterhin könnte z.B. durch N- bzw. C-terminale Pep1-HA-Tags die Spaltung mittels Western Blot verfolgt werden.

### 3.3 Pep1 ist ein konserviertes Effektorprotein

Doehlemann *et al.* (2009) zeigten, dass die Trunkierung des C-Terminus von Pep1 ( $\Delta$ AS 141-178) im Bereich der Glycin-reichen-Region keinen Pathogenitätsverlust zur Folge hatte. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen wichen von diesem Ergebnis leicht ab und es wurde eine geringfügige Abnahme der Pathogenität der Stämme mit C-terminal trunkiertem Pep1 festgestellt (vgl. 2.2).

Um den funktionellen Bereich des Proteins weiter einzugrenzen, wurde eine weitere, N-terminale Trunkierung eines kurzen 16 AS-langen, zwischen *U. maydis* und *U. hordei* nicht konservierten Bereiches, vorgenommen. Die Deletion dieser Region ( $\Delta$ AS 27-42), zusätzlich zur C-terminalen Trunkierung ( $\Delta$ AS 141-178), führte aber zu keinem weiteren Virulenzverlust. Somit scheint dieser N-terminale Bereich von Pep1 für die Funktion des Effektors keine Rolle zu spielen. Eine mögliche Funktion z.B. auf anderen Mais-Varietäten oder bisher unbekanntem Wirtspflanzen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Weil die C-terminale Trunkierung zu einem nur geringen und die N-terminale Trunkierung keinen zusätzlichen Pathogenitätsverlust zur Folge haben, ist abzuleiten, dass der mittlere, in weiten Teilen konservierte Bereich von Pep1 für die Funktion des Effektors essentiell ist.

Pep1 zeigt einen hohen Grad der Konservierung zwischen verwandten Brandpilzspezies. Der Sequenzvergleich zwischen *U. maydis* und *U. hordei*-Pep1 zeigte, dass insbesondere im mittleren Bereich des Proteins (AS 42-136) ein hoher Konservierungsgrad von 81 % vorliegt (Doehlemann *et al.*, 2009). Da die durch Doehlemann *et al.* (2009) gesetzte C-terminale Trunkierung ( $\Delta$ AS 141-178) keinen bzw. einen nur geringen Pathogenitätsverlust zur Folge hatte, wurde geschlussfolgert, dass diese Region für die Funktionalität des Proteins keine Rolle spielt (Doehlemann *et al.*, 2009). Eine ähnliche Beobachtung wurde für den *U. maydis* Effektor Stp1 gemacht. Auch bei Stp1 führte die Deletion des variablen Bereichs, welcher ca. 40 % des Proteins ausmacht, zu keinem Funktionsverlust (Schipper, 2009). Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass diese heterogenen Regionen beider Effektoren möglicherweise eine Art Schutzsequenz darstellen, indem sie die eigentlichen funktionellen (konservierten) Bereiche gegenüber dem pflanzlichen Immunsystem maskieren (Schipper, 2009).

Da Effektoren, genau wie pflanzliche R-Proteine, einem starken diversifizierenden Selektionsdruck unterliegen, (Jones und Dangl, 2006; Dodds *et al.*, 2009), könnte die Variabilität des Pep1-C-Terminus somit auch der Vermeidung einer Erkennung durch das pflanzliche Immunsystem dienen.

Auffallend ist, dass der Pep1-C-Terminus reich an Glycin und Serin ist. Diese Eigenschaft trifft auch auf sogenannte Harpine zu. Dies sind kleine, durch phytopathogene Bakterien sekretierte Proteine, die zwar HR auslösen, allerdings auch die Translokation anderer Effektoren z.B. durch Porenformation vermitteln (Kim und Beer, 1998; Bocsanczy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Aufgrund dieser Tatsache, dass der Pep1-C-Terminus über viele Serine und Glycine verfügt sowie der Beobachtung des geringen Pathogenitätsverlustes nach Trunkierung der Region erschien es sinnvoll, eine mögliche Funktion dieses Bereiches zu untersuchen. Da dem ursprünglichen, durch Doehlemann *et al.* (2009) trunkierten Pep1-C-Terminus diverse Glycine und Serine vorgelagert sind, wurden 16 weitere Aminosäuren des heterogenen Pep1-C-Terminus in das Komplementationskonstrukt eingebunden (AS 125-178).

Überraschender Weise zeigte sich, dass die Expression der Pep1-Aminosäuren 125-178 zur partiellen Restauration der Pathogenität im  $\Delta pep1$ -Hintergrund führte. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt allein auf den 16 zusätzlich eingebundenen Aminosäuren beruht, müsste z.B. nur mit dem durch Doehlemann *et al.* (2009) trunkierten Pep1-C-Terminus (AS 141-178) komplementiert werden. Insgesamt implizieren die Beobachtungen aller Phänotypen im Rahmen der durchgeführten Infektionsversuche eine bislang noch unklare Funktion des Pep1-C-Terminus. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre die Annahme einer Bifunktionalität des Effektors. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit tatsächlich die Inhibition zweier Enzymklassen durch Pep1 beobachtet. So inhibiert Pep1 die Aktivität verschiedener apoplastischer Papain-ähnlicher Cysteinproteasen und die Aktivität der sekretierten *Horseradish* Peroxidase sowie der Mais-Peroxidase-12. Ob die Inhibition dieser beiden Enzymklassen unabhängig vom Pep1-N- bzw. C-Terminus vermittelt wird, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

### 3.4 Inhibition Papain-ähnlicher Cysteinproteasen durch Pep1

Für eine effektive Suppression der Pflanzenabwehr spielt die Inhibition von Proteasen, insbesondere Papain-ähnlicher Cysteinproteasen, während der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen eine besondere Rolle, wie z.B. die Experimente mit Insektenlarven und Papayablättern belegen (vgl. 1.6) (Konno *et al.*, 2004; Shindo und van der Hoorn, 2008). Für *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass im Mais-Apoplasten Papain-ähnliche Cysteinproteasen präsent sind und dass diese durch Aktivierung von Salicylsäure-Signalwegen zusätzlich induziert werden können. Demnach kommen Effektoren, welche initial sekretiert werden, mit apoplastischen Papain-ähnlichen Cysteinproteasen der Pflanzenabwehr in Kontakt.

Sowohl die DCG-04-Markierungsexperimente, als auch *in vitro* Versuche mit apoplastischem Fluid aus Mais belegten die inhibitorische Wirkung von Pep1 gegenüber Papain-ähnlichen Cysteinproteasen. Es zeigte sich, dass Pep1 nicht alle Proteasen dieser Familie gleichermaßen effektiv hemmt. So inhibierte der Effektor die verschiedenen Fraktionen des apoplastischen Fluids mit unterschiedlicher Effizienz. Auch war die Hemmung der Aktivität Papain-ähnlicher Cysteinproteasen durch Pep1 in den betreffenden Fraktionen nicht vollständig. Im Mittel lag die durch Pep1-Zugabe vermittelte Inhibition der untersuchten aktiven Fraktionen bei ca. 65 %, wobei maximal eine Hemmung von ca. 85 % in einer der Fraktionen erreicht wurde (vgl. Abb. 23). Interessanterweise wurde diese maximale Inhibition in der Fraktion mit der höchsten Proteaseaktivität gemessen. Zudem wurde in den DCG-04-Experimenten beobachtet, dass nach Salicylsäure-Infiltration die Konzentration Papain-ähnlicher Cysteinproteasen im Blattextrakt ansteigt.

Trotz dieser erhöhten Protease-Konzentration, im Vergleich zu unbehandeltem Blattmaterial, war die Inhibition dieser Salicylsäure-induzierten Papain-ähnlichen Cysteinproteasen durch Pep1 sehr effizient. Außerdem inhibierte Pep1 eine Prozessierungsform der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen RD19A aus *A. thaliana*, während der Effektor keine Wirkung auf andere getestete Papain-ähnliche Cysteinproteasen ausübte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Pep1 offenbar nicht alle, sondern spezifische Abwehr-induzierte Papain-ähnliche Cysteinproteasen inhibiert.

Wie unter 3.2 beschrieben, könnten die zwei putativen Disulfidbrücken von Pep1 eine hohe Stabilität des Effektors gegenüber proteolytischen Attacken vermitteln. Des Weiteren enthält Pep1 zwei putative Serineprotease-Inhibitormotive (vgl. 2.7). Punktmutationen innerhalb dieser hatten eine Abnahme der Pathogenität zur Folge. Vor allem die Substitutionen innerhalb des zweiten Motives führten zu einem nahezu apathogenen Phänotyp auf der Pflanze. Außerdem konnte mikroskopisch gezeigt werden, dass die mutierte Pep1-Variante sekretiert im Apoplasten vorliegt und dass das Lokalisierungsmuster dem des nativen Proteins entsprach. Trotz des dramatischen Phänotyps in Folge der Punktmutation(en) konnte aber weder mittels aktivitäts-basiertem Protein *Profiling* noch durch *in vitro* Inhibitionstests mit Trypsin (Daten nicht gezeigt) eine Inhibition von Pep1 gegenüber Serinproteasen beobachtet werden. Vielmehr zeigte sich, dass in Folge einer *U. maydis* SG200-Infektion mindestens eine weitere Serinprotease aktiviert wird (vgl. Abb. 19). Ob diese von *U. maydis* oder von Mais selbst stammt und welche Rolle sie während der Infektion spielt, ist derzeit unklar.

Pep1 weist also strukturelle Merkmale verschiedener Proteaseinhibitoren auf, wirkt aber nur spezifisch auf Papain-ähnliche Cysteinproteasen inhibierend. Außerdem führte die Pep1-Zugabe in keinem der Assays zu einer vollständigen Inhibition der Aktivität Papain-ähnlicher Cysteinproteasen. Vielmehr zeigte sich, dass insbesondere abwehrinduzierte Papain-ähnliche Cysteinproteasen durch Pep1 inhibiert werden. In Zusammenarbeit mit Farnusch Kaschani (MPIZ, Köln) wurden in apoplastischen Fluid von Salicylsäure-infiltrierten Blättern fünf Papain-ähnliche Cysteinproteasen identifiziert (Daten nicht gezeigt). Ob alle fünf oder nur eine/einige dieser Proteasen in Folge der Salicylsäure-Infiltration induziert wurden, muss noch geklärt werden. Derzeit wird versucht, die betreffenden Proteasen aufzureinigen, um weiterführende *in vitro* Experimente durchführen zu können. Interessant wäre hierbei zu klären, ob und wenn ja welche dieser Proteasen durch Pep1 inhibiert wird/werden. Durch enzymkinetische Messungen, wie etwa der Bestimmung von Dissoziationskonstanten, könnte außerdem die Art der Pep1-Inhibition (kompetitiv/nicht kompetitiv) gegenüber der/den betreffenden Protease(n) geklärt werden.

### 3.5 Die Bedeutung der Pep1/Peroxidase-Interaktion für den oxidativen *Burst*

Bis vor ca. 10 Jahren wurde die Bildung von ROS während des oxidativen *Burst* vorrangig den NADPH-Oxidasen zugeordnet, während Peroxidasen hauptsächlich als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-spaltende Enzyme betrachtet wurden (Bolwell, 1999). Dementsprechend existiert eine Vielzahl von Publikationen, welche vor allem die Rolle der NADPH-Oxidase für den oxidativen *Burst* im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort herausstellen (Segal und Abo, 1993; Bolwell *et al.*, 1995; Doke *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1998). Diese vorherrschende Lehrmeinung wurde jedoch gekippt und trotz des zunächst paradox erscheinenden Reaktionsmechanismus ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass zellwand-assoziierte- und sekretierte Peroxidasen im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort eine wichtige ROS-Quelle während des oxidativen *Burst* darstellen können (Martinez *et al.*, 1998; Bolwell, 1999; Apel und Hirt, 2004; Bindschedler *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006; Lüthje *et al.*, 2011).

Charakteristisches Merkmal des pflanzlichen oxidativen *Burst* ist die schnelle, binnen weniger Minuten nach Pathogen-Erkennung auftretende Immunreaktion (Apostol *et al.*, 1989; Lamb und Dixon, 1997). Parallel dazu wird ein temporärer Anstieg des pH-Wertes im Apoplasten verzeichnet, wobei sich pH-Änderung und ROS-Produktion linear zueinander verhalten (Bolwell *et al.*, 1995; Fellbrich *et al.*, 2000; Bindschedler *et al.*, 2001; Bolwell *et al.*, 2002; Mentlak *et al.*, 2012). *In vitro* Versuche mit der *Horseradish* Peroxidase sowie anderen apoplastischen Peroxidasen belegen, dass die Peroxidase-abhängige ROS-Produktion während dieses pH-Anstieges ihr Maximum erreicht. Dies zeigt, dass es eine Korrelation zwischen apoplastischem oxidativen *Burst* und transientser Alkalisierung gibt (Bolwell *et al.*, 1995; Chen und Schopfer, 1999; Bolwell *et al.*, 2002).

Pep1 inhibiert die sekretierte *Horseradish* Peroxidase *in vitro*. Mittels eines Far-Western-Experiments konnte gezeigt werden, dass diese Inhibition auf einer direkten Interaktion beider Proteine beruht. DAB-Färbungen in apoplastischem Maisfluid zeigten eine sehr schnelle und farbintensive Reaktion. Dies deutet darauf hin, dass sowohl reaktive Sauerstoffspezies als auch sekretierte Peroxidasen in hoher Konzentration im apoplastischen Fluid vorliegen. Durch Pep1-Zugabe kann diese Farbreaktion effektiv gehemmt werden. Dies belegt, dass Pep1 auch apoplastische Peroxidasen hemmt. Allerdings kann die Reaktion

nicht vollständig inhibiert werden. Ursache hierfür könnte sein, dass der Effektor nicht alle Peroxidasen inhibiert, oder andere Enzyme, wie z.B. Katalasen (Fahimi, 1979), die DAB-Reaktion katalysieren.

Während der *U. maydis*-Infektion sind eine Reihe von Mais-Peroxidasen transkriptionell induziert. Vergleicht man jedoch eine *U. maydis*-Wildtyp-Infektion mit einer  $\Delta pep1$ -Infektion, fällt auf, dass explizit nur die sekretierte Mais-Peroxidase-12 transkriptionell induziert wird (Doehlemann *et al.*, 2009). Mittels eines optimierten Split-YFP-Systems konnte *in vivo* die Interaktion zwischen Pep1 und der sekretierten Peroxidase-12 bewiesen werden (Hemetsberger *et al.*, 2012). Außerdem konnte durch Virus-induziertes-Gen-*silencing* der Peroxidase-12 eine Restauration des  $\Delta pep1$ -Phänotyps auf POX12si-Pflanzen bewirkt werden. Anhand mikroskopischer Analysen wurde der Infektionsverlauf durch die Pep1-Deletionsmutante auf den POX12si-Pflanzen verfolgt. So war eine deutliche Reduzierung der Papillenbildung klar zu erkennen. In Folge dessen gelangen dem  $\Delta pep1$ -Stamm nach 2 dpi multiple Zell/Zell-Penetrationen bis in tiefliegende Mesophyllschichten. Allerdings konnte die starke Hyphenproliferation, wie sie typischer Weise nach zwei Tagen während der Wildtyp-Infektionen auftritt, nicht beobachtet werden. Aufgrund des transienten Charakters des VIGS wurden keine weiteren Krankheitssymptome nach  $\Delta pep1$ -Infektion quantifiziert. Daher wäre es interessant z.B. mit stabilen POX12-RNAi-Maislinien zu testen, ob der pep1-Deletionsstamm alle Symptome einer Wildtypinfektion etablieren könnte.

Die durchgeführten Experimente belegen, dass Pep1 durch physische Interaktion Peroxidase-Aktivität hemmt. Eine *in silico* Überprüfung der in den VIGS-Experimenten verwendeten siRNA-Konstrukte ergab, dass neben der Peroxidase-12 zwei weitere Peroxidasen putativ *co-gesilencend* werden könnten.

Da allerdings keine der beiden Peroxidasen während einer  $\Delta pep1$ -Infektion transkriptionell induziert wird, scheint die Funktion dieser während des oxidativen *Burst* keine besondere Rolle zu spielen.

Derzeit geht man davon aus, dass der oxidative *Burst* durch ein Zusammenspiel zwischen NADPH-Oxidasen und apoplastischen Peroxidasen gesteuert wird (Bolwell *et al.*, 2002; Apel und Hirt, 2004; Daudi *et al.*, 2012). Neuere Studien deuten zudem darauf hin, dass in Abhängigkeit der Wirts/Mikroorganismen-Interaktion verschiedene oxidative *Burst*-Profile etabliert werden (Bindschedler *et*

*al.*, 2006). Je nach Art der Interaktion werden somit die beiden ROS-produzierenden Systeme mehr oder weniger stark eingebunden (Grant und Loake, 2000; Apel und Hirt, 2004; Bindschedler *et al.*, 2006). So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass das *Silencing* der NADPH-Oxidase *HvRBOHF2* eine verstärkte Anfälligkeit von Gerste gegenüber dem echten Mehltau *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* aufweist. Zudem zeigten die Pflanzen weniger Zelltodsymptome nach Verwundung im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Proels *et al.*, 2010). Interessanterweise konnte an den *Silencing*-Pflanzen aber keine Abnahme der ROS-Produktion festgestellt werden. So zeigten die Pflanzen eine normale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion an den Penetrationsstellen und auch die Papillenbildung sowie die Induktion einer hypersensitiven Reaktion war zu beobachten. Außerdem zeigten die Pflanzen einen voll etablierten oxidativen *Burst* nach PAMP-Zugabe (Proels *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen können entweder auf funktionell redundante NADPH-Oxidasen hinweisen oder aber andere Systeme, wie etwa apoplastische Peroxidasen, die an basalen Abwehrreaktionen der Pflanze beteiligt sind.

Während einer *U. maydis*  $\Delta pep1$ -Infektion kommt es auf der Maispflanze ebenfalls zur Induktion der hypersensitiven Abwehrreaktion, wobei die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, welche insbesondere im Apoplasten um die penetrierende Hyphe herum akkumulieren, zu beobachten ist. Die Tatsache, dass Pep1 den oxidativen *Burst* inhibiert, passt somit zum beobachteten  $\Delta pep1$ -Phänotyp.

Das Mais-Genom kodiert für ca. 150 Peroxidasen. Beide, *Horseradish*-Peroxidase und Peroxidase-12, werden durch Pep1 inhibiert, weisen aber nur ca. 37 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene auf. Proteomanalysen von Mais-Xylemsaft sowie des Xylems anderer Pflanzen belegen, dass verschiedene sekretierte Peroxidasen in diesen Pflanzensäften vorhanden sind (Buhtz *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2006; Houterman *et al.*, 2007). Daher ist es wahrscheinlich, dass neben der Peroxidase-12 weitere Peroxidasen im apoplastischen Maisfluid vorliegen.

Dennoch deuten die spezifische transkriptionelle Aktivierung der Peroxidase-12 während der  $\Delta pep1$ -Infektion sowie die partielle Restauration des  $\Delta pep1$ -Phänotyps auf den POX12si-Pflanzen auf eine besondere Rolle der Peroxidase-12 im apoplastischen oxidativen *Burst* im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort hin.

Es wäre zu klären, inwieweit sich die Beobachtungen der Pep1/Peroxidase-Inhibition von *U. maydis* und die *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*-Versuche auf



*HvRBOHF2-silencing*-Pflanzen verknüpfen lassen. Beide Organismen sind biotrophe Pathogene und in beiden Fällen scheint die Unterdrückung eines Peroxidase-vermittelten oxidativen *Burst* von essentieller Bedeutung zu sein. Da auch in der Literatur die Ausbildung spezifischer oxidativer *Burst*-Profile in Abhängigkeit der Wirts/Pathogen-Interaktion gezeigt wurde (Bindschedler *et al.*, 2006), deutet sich hier ein möglicherweise genereller Mechanismus der Pflanzenabwehr gegenüber biotrophen Pathogenen an.

Daher wäre zu ermitteln, inwieweit sich auf den POX12si-Pflanzen Elicitor- bzw. Pathogen-abhängige oxidative *Burst*-Profile beobachten lassen. Die Analysen sollten dabei nicht nur die Ausbildung einer bzw. beider Phasen des oxidativen *Burst* erfassen, sondern auch klären, inwieweit beide ROS-generierende Systeme (NADPH-Oxidasen und/oder Peroxidasen) involviert sind. Dabei wäre zu untersuchen, ob typische Elicitoren, wie Chitin oder Flagellin, auf den POX12si-Pflanzen eine ROS-Produktion auslösen. Weiterführend wäre ein Vergleich von biotropher *U. maydis*  $\Delta pep1$ -Infektion mit einer Nekrotrophen, z.B. durch *Cochliobolus heterostrophus* auf den POX12si-Pflanzen denkbar. So könnte hier unter Umständen die in der Literatur vorgeschlagene differenzielle Aktivierung beider ROS-produzierender Systeme (Bindschedler *et al.*, 2006) auf einer Wirtspflanze in Abhängigkeit des Pathogens beobachtet werden.

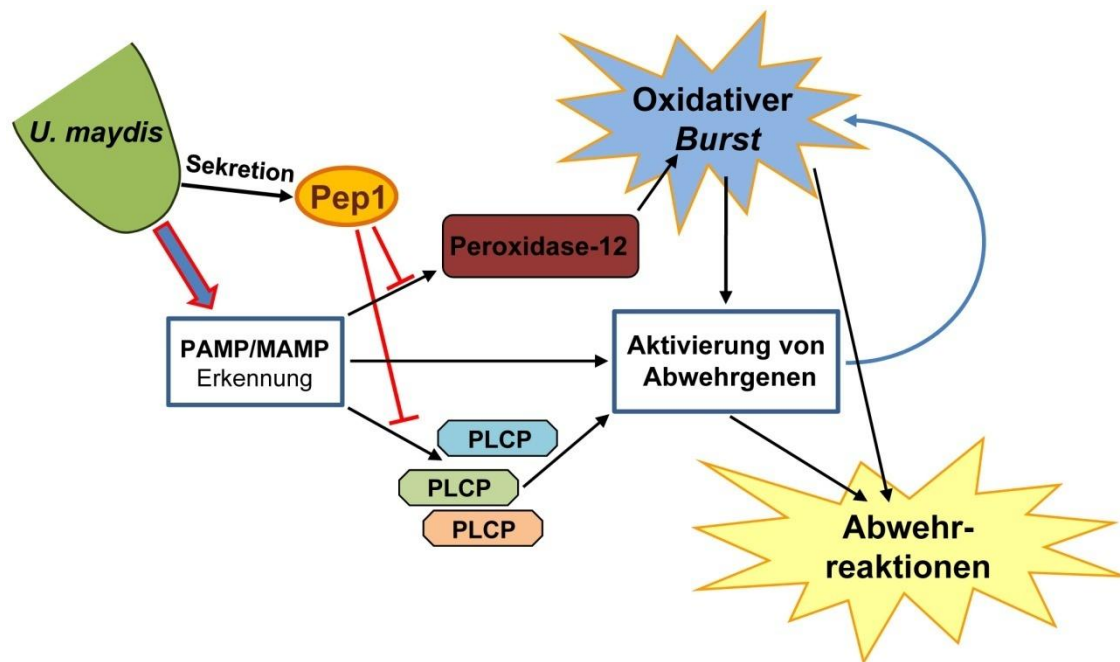
Insgesamt könnten diese Analysen dazu beitragen, die spezifische Pep1/Peroxidase-12-Interaktion im komplexen Hintergrund des oxidativen *Burst* genauer zu verstehen sowie durch Analyse eventuell verschiedener oxidativer *Burst*-Profile zum Verständnis dieser basalen pflanzlichen Abwehrreaktion beitragen.

### **3.6 Pep1 inhibiert Peroxidase- und Proteaseaktivität**

Fasst man die beobachteten Phänotypen sowie die gezeigte Inhibition Papain-ähnlicher Cysteinproteasen und Peroxidasen zusammen, so kann als wahrscheinliches Modell das eines bifunktional wirkenden Pep1 abgeleitet werden. So könnte der Effektor, möglicherweise proteolytisch in zwei Teile gespalten, beide Enzymklassen unabhängig voneinander inhibieren. Interessant ist, dass Doehlemann *et al.* (2009) bereits die Spaltung von Pep1 beobachteten. Passend zum oben beschriebenen Modell erfolgt dabei eine Spaltung innerhalb

des Pep1-C-Terminus (Doehlemann *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass die Komplementationen, entweder mit dem N- oder C-terminalen Teil von Pep1, zu einem unterschiedlich starken Virulenzverlust führen, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Inhibition eines der beiden Zielproteine essentieller ist als die des anderen.

Ein wahrscheinliches Szenario wäre, dass Pep1 in voller Länge sekretiert im Apoplasten vorliegt und sein konservierter Mittelteil durch den heterogenen C-Terminus maskiert wird. Erreicht der konservierte Mittelteil sein Zielprotein, z.B. eine apoplastische Cysteinprotease, könnte der variable C-Terminus abgespalten werden. Der konservierte mittlere Teil könnte in diesem Modell eine Papain-ähnliche Cysteinproteasen inhibieren, während der C-Terminus die Peroxidase-12 inhibiert (Abb. 30). Ein umgekehrtes Szenario wäre ebenfalls vorstellbar.



**Abbildung 30. Modell der möglichen bifunktionalen Wirkungsweise des *U. maydis* Effektors Pep1.** Nach der Sekretion von Pep1 in die biotrophe Interaktionszone, inhibiert der Effektor Papain-ähnliche Cysteinproteasen (PLCP) sowie die Peroxidase-12 der Wirtspflanze Mais. Diese Inhibition führt zur Suppression der durch die beiden Zielproteine vermittelten Abwehrreaktionen der Pflanze, wie der Aktivierung von Abwehrgenen bzw. des oxidativen *Burst*.

Allerdings steht dieses Modell zunächst im scheinbaren Widerspruch zum drastischen Pathogenitätsverlust nach Mutation des putativen Protease-Inhibitormotivs trotz des Vorhandenseins der eigentlich noch funktionellen G/S-Region (vgl. 2.5).

Allerdings erklärt sich der Effekt, wenn man bedenkt, dass der mittlere Teil von Pep1 aufgrund seines hohen Konservierungsgrades ein ideales Ziel pflanzlicher

R-Proteine darstellt. Selbst unter der Annahme einer Schutzfunktion durch die G/S-Region ist es unwahrscheinlich, dass sich ein funktionell stark beeinträchtigt, jedoch permanent sekretiertes Protein dauerhaft der Erkennung durch das pflanzliche Immunsystem entziehen kann.

Eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Pep1 gegenüber den verschiedenen apoplastischen Papain-ähnlichen Cysteinproteasen bzw. gegenüber der Peroxidase-12 könnten Hinweise darauf geben, ob es sich bei einer der beiden Inhibitionen möglicherweise um einen intrinsischen Effekt handelt. Um zu klären, welcher Teil von Pep1 zur Inhibition der Protease- bzw. der Peroxidaseaktivität beiträgt, müssten beide Teile von Pep1 heterolog exprimiert werden und in den etablierten *in vitro* Assays getrennt voneinander untersucht werden.

### **3.7 Bedeutung von Pep1 für die Virulenz von *U. maydis***

Die artübergreifende Konservierung von Pep1 (vgl. Kapitel X) ist untypisch für sekretierte Effektoren. Nach der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1942) sowie dem ZigZag-Modell (Jones und Dangl, 2006) müsste die Entwicklung entsprechender R-Proteine in den betroffenen Wirtspflanzen eine Diversifizierung des Effektors zur Folge haben. Da dies nicht der Fall ist, stellt sich die Frage, warum die Wirtspflanzen dazu offenbar nicht in der Lage sind.

Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte darin begründet liegen, dass Pep1 möglicherweise einem essentiellen Pflanzenprotein ähnelt, dessen Funktion und Struktur ebenfalls stark konserviert sind. Die Entwicklung spezifischer R-Proteine würde in den Wirtspflanzen eine Auto-Immunreaktion zur Folge haben, die offenbar so drastisch wäre, dass die Pflanze diese gar nicht oder nur stark beeinträchtigt überleben würde. Auch scheinen Mutationen oder Verlust des Proteins für die Wirtspflanzen von so großem Nachteil zu sein, dass sich diese evolutionär nicht durchsetzen konnten.

Eine weitere Ursache könnte in der vorgeschlagenen Schutzfunktion des konservierten Bereichs von Pep1, durch seinen variablen C-Terminus liegen. Daher wäre zu untersuchen, ob z.B. die Wirtspflanze Mais in der Lage wäre, über mehrere Generationen hinweg gegen die C-terminal trunke Pep1-Version von *U. maydis* ein entsprechendes R-Protein zu bilden. Dies würde die Schutzfunktion

des variablen Pep1-C-Terminus belegen und könnte Hinweise für eine mögliche Schutzfunktion ähnlicher Regionen anderer Effektoren, wie z.B. des *U. maydis* Effektors Stp1 (vgl. 3.3), geben. Aufgrund der langen Generationszeiten von Mais wäre parallel ein alternativer Ansatz denkbar. Dieser würde darauf abzielen, die zum konservierten Pep1-Bereich ähnlichen Pflanzenproteine zu identifizieren. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper, welche den konservierten Pep1-Bereich als Epitop erkennen, könnten die entsprechenden Pflanzenproteine detektiert werden. Mittels Pulldown-Experimenten und anschließender Massenspektrometrie könnte(n) das/die Pflanzenprotein(e) identifiziert werden.

### 3.8 Ausblick

Peroxidasen und Proteasen sind von zentraler Bedeutung im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort (Dangl und Jones, 2001; Konno, 2011). Pep1 wirkt inhibitorisch auf beide Enzymklassen. Die heterologe Aufreinigung der Peroxidase-12 bzw. apoplastischer Papain-ähnlicher Cysteinproteasen ist derzeit zentraler Forschungsgegenstand unserer Arbeitsgruppe und bildet die Grundlage weiterführender Experimente. So soll z.B. mittels enzymkinetischer Analysen, die Natur der Interaktion (kompetitive/nicht kompetitive Inhibition) von Pep1 mit der Peroxidase-12 bzw. apoplastischer Papain-ähnlicher Cysteinproteasen geklärt werden. Um die Frage nach einer möglichen Bifunktionalität des Effektors zu beantworten, könnten Versuche bezüglich der Wirkung des N- bzw. C-terminalen Bereichs von Pep1 auf die Zielproteine durchgeführt werden. Zudem wäre die Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit zwischen Cysteinprotease- und Peroxidaseaktivität vorstellbar. Da die Anwesenheit von ROS sowie die in der Literatur beschriebene transiente Alkalisierung (vgl. 3.5) theoretisch zur Inaktivierung von Cysteinproteasen führen müssten (Oxidation des Nukleophils), wäre z.B. die Erstellung eines Aktivitätsprofils beider Enzymklassen während/nach dem oxidativen *Burst* interessant. Insbesondere die Fähigkeit der Klasse-III-Häm-Peroxidasen, je nach chemischer Ausgangssituation (z.B. Angebot an zu reduzierendem Substrat wie NADH) ihre katalytische Aktivität umzukehren, könnte eine entscheidende Rolle bei der Regulation des oxidativen *Burst* spielen.

Das Verständnis vom Ineinandergreifen basaler Abwehrmechanismen würde so zu einem vollständigeren Bild der komplexen biochemischen Prozesse während der frühen Abwehrreaktionen der Pflanzen beitragen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, von der Qualität *p. a.* und wurden vorwiegend von den Firmen Difco (Augsburg), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, soweit notwendig, vor Verwendung für 5 min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2 µm; Merck, Darmstadt) sterilfiltriert.

#### 4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion<sup>®</sup> *Hot Start High-Fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn), KOD Xtreme<sup>™</sup> Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt), Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) sowie der die Taq-Polymerase enthaltende RedMix (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mit der T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim) durchgeführt. Für den enzymatischen Abbau von RNA wurde RNase A (Serva, Heidelberg) verwendet. Enzymatischer Abbau von Zellwänden erfolgte mit Lysozym (Roche, Mannheim) und Novozym 234 (Novo Nordisc; Kopenhagen, Dänemark). Antikörper wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Cell Signaling Technology (Danver, USA), Eurogentec (Serain,

Belgien) und Invitrogen (Carlsbad) bezogen. Eine detaillierte Auflistung der Antikörper findet sich in Kapitel 4.6.1.

#### 4.1.4 Verwendete Kits

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen sowie zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Wizard<sup>®</sup> SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) verwendet. Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das QIAprep<sup>®</sup> Mini Plasmid Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Zur Insertion von Punktmutationen in Plasmiden wurde das QuikChange (Multi) Kit (Stratagene, LaJolla/USA) verwendet. Spezielle Kits sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

## 4.2 Zellkultivierung

### 4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* Stämme wurden in dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C und 200 U/min kultiviert. Antibiotikazugaben erfolgten nach den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert. In Expressionsstämmen, bei welchen die Expression auf dem IPTG-Induktionssystem beruhte, wurde zwischen 1 und 5 % (w/v) Glucose zur Unterdrückung einer unerwünschten Aktivierung der T7-Polymerase zugefügt (vgl. 4.6.6).

Antibiotikum	Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ampicillin (Amp)	100
Chloramphenicol (Cam)	34
Kanamycin (Kan)	50
Tetrazyklin (Tet)	2,5

**Tabelle 2:** Für Bakterienkulturen verwendete Antibiotika.

dYT-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

1,6 % (w/v) Trypton-Pepton  
 1,0 % (w/v) Hefeextrakt  
 0,5 % (w/v) NaCl  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

YT- Festmedium	0,8 % (w/v) Trypton-Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1,3 % (w/v) Agar in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
----------------	--

#### 4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

Die in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Kulturen wurden standardmäßig in Yeps-*light*-Flüssigmedium bei 28°C und 200 U/min inkubiert. Für Festmedien wurden *Potato*-Dextrose-Agarplatten, ggf. mit entsprechenden Antibiotikazusätzen (Tabelle 3), verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50 % NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen ÜN-Kultur.

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]
Carboxin (Cbx)	2
Hygromycin (Hyg)	200
Phleomycin (Phleo)	5

**Tabelle 3:** Für die Kultivierung von *U. maydis*-Derivaten verwendete Antibiotika.

Yeps- <i>light</i> (modifiziert nach (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988))	1 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Pepton 1 % (w/v) Saccharose in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
<i>Potato</i> -Dextrose-Agar (PD)	2,4 % (w/v) <i>Potato</i> -Dextrose <i>Broth</i> 2 % (w/v) Bactoagar in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
PD- <i>Charcoal</i>	wie PD-Vollmedium, jedoch zusätzlich 1,0 % (w/v) Aktiv- kohlepulver
NSY-Glycerin	0,8 % (w/v) <i>Nutrient Broth</i> 0,1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Saccharose 69,6 % (v/v) Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>



### 4.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novaspecll Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die  $OD_{600nm}$  des entsprechenden Kulturmediums verwendet. Bei *U. maydis* entspricht eine  $OD_{600nm}$  von 1,0 etwa einer Zellzahl von  $1-5 \times 10^7$  Zellen. Bei *E. coli* entspricht selbiger Wert etwa  $1 \times 10^9$  Bakterienzellen.

## 4.3 Stämme, Oligonukleotide und Plasmide

### 4.3.1 *E. coli* Stämme

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und deren Verwendungszweck dargestellt.

**Tabelle 4: Verwendete *E. coli* Stämme.**

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz/Bezug
K-12 Top10 [F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacO</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> $\Delta$ 139 $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galK</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> ]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Grant <i>et al.</i> , 1990)/ Invitrogen (Karlsruhe)
K-12 DH5 $\alpha$ [F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1</i> <i>hsdR</i> 17 ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE</i> 44 $\lambda$ <i>thi-I gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Hanahan, 1983)/ Gibco/BRL (Eggenstein)
BL21 Rosetta-gami (DE3)pLysS [ $\Delta$ <i>ara-leu</i> 7697 $\Delta$ <i>lacX</i> 74 $\Delta$ <i>phoA</i> <i>PvuII phoR araD</i> 139 <i>ahpC galE</i> <i>galK rpsL</i> (DE3) F <sup>+</sup> [ <i>lac</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>f</sup> <i>pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB pRARE</i> (Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )]	Proteinexpression  K-12 Origami-Derivat; Unterstützung der Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma durch das Fehlen zweier Enzyme (TrxB und Gor), wodurch Kan und Tet-Selektion notwendig wird.	Novagen/Merck (Darmstadt)

### 4.3.2 *U. maydis* Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* Ausgangsstämme (Tabelle 5) sowie die in dieser Arbeit hergestellten Stämme (Tabelle 6) beschrieben. Bei der Herstellung von Deletionsmutanten wurde das jeweilige Gen nach Kämper (2004)

und Brachmann *et al.* (2004) durch eine Resistenzkassette ersetzt (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper, 2004). Für die Integration von Genen in den *ip*-Lokus wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ip<sup>R</sup>*) tragen (Broomfield und Hargreaves, 1992). Diese Plasmide wurden über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven, *ip*-Allel (*ip<sup>S</sup>*) in das Genom von *U. maydis* eingebracht. Alle Stämme wurden durch Southern-Analysen verifiziert. In Stämmen, die eine Insertion im *ip*-Lokus tragen, ist das entsprechende Konstrukt, wenn nicht anders vermerkt, in einfacher Kopie inseriert. Die Plasmide zur Herstellung der Stämme sind in Kapitel 4.3.4 beschrieben.

**Tabelle 5: Verwendete *U. maydis*-Ausgangsstämme**

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	Phleo	Kämper <i>et al.</i> , 2006
SG200Δ <i>pep1</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1</i>	Phleo, Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200Δ <i>pep1-pep1</i>	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δpep1::hph ip<sup>r</sup>[Pwt-um-pep1]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>ΔAS141-178</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1Δ141-178]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> :GFP	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δpep1::hph ip<sup>r</sup>[Pwt-um-pep1-egfp]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200Δ <i>pep1rfp</i>	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δpep1::hph ip<sup>r</sup>[Potef-rfp]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009

**Tabelle 6: In dieser Arbeit generierte *U. maydis*-Stämme**

Name	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>ΔAS27-42,ΔAS141-178</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1 ΔAS27-42,Δ141-178]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>ΔAS141-178</sup>
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>AS125-178</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1Δ125-178]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200Δ <i>pep1</i>
SG200- <i>pep1</i> <sup>AS125-178</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1Δ125-178]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	SG200
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>CS59,94</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1CS59,94]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200Δ <i>pep1</i>
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>VA54</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA54]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200Δ <i>pep1</i>
SG200Δ <i>pep1-pep1</i> <sup>VA56</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA56]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200Δ <i>pep1</i>

SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>VA58</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA58]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>PA62</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1PA62]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>PA91</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1PA91]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>VA95</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA95]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>VA56,PA91</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA56,PA91]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>VA58,PA62</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA58,PA62]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>VA56,VA58</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA56,VA58]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1
SG200 $\Delta$ pep1-pep1 <sup>VA54,VA58,PQ62</sup> :GFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 <math>\Delta</math>pep1 ip<sup>r</sup>[P<sub>pep1</sub>:pep1VA54,VA58,PQ62]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 $\Delta$ pep1

### 4.3.3 Oligonukleotide

In der Tabelle 7 werden alle in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Oligonukleotide aufgeführt.

**Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.** Die Sequenzen sind in 5' zu 3' Richtung angegeben und die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Jedes Oligonukleotid hybridisiert entweder mit dem sense-Strang [RV] oder mit dem komplementären Strang [FW] des jeweiligen Gens.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
CH01	CATG <u>CCATGG</u> ATGCCTCTGGCC AGCACGTTT	Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ N <sup>AS1-41</sup> /C <sup>AS141-178</sup> kodiert; für die Integration in den Vektor pTXB3; führt eine NcoI-Schnittstelle ein, [FW]
CH02	CGGA <u>ATTC</u> CTTGGCTTGAACCG CATC	Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ N <sup>AS1-41</sup> /C <sup>AS141-178</sup> kodiert; für die Integration in den Vektor pTXB3; führt eine EcoRI-Schnittstelle ein, [RV]
CH03	TTGGATCC <u>CC</u> CTCTGGCCAGCAC GTTT	Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ N <sup>AS1-41</sup> /C <sup>AS141-178</sup> kodiert; für die Integration in den Vektor pTXB3; führt eine BamHI-Schnittstelle ein, [FW]

CH04	CATGCCATGGTTACTTGGCTTG AACCGCATC	Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ N <sup>AS1-41</sup> /C <sup>AS141-178</sup> kodiert; für die Integration in den Vektor pTXB3; führt eine NcoI-Schnittstelle ein, [RV]
CH05	GAGCGGATAACAATTCCC	Primer für die Sequenzierung von Genen, die standardmässig in den pTXB3-Vektor inseriert wurden, [FW]
CH09	CCGCTCGAGCCTCTGGCCAGC ACGTTT	Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ N <sup>AS1-41</sup> /C <sup>AS141-178</sup> kodiert; für die Integration in den Vektor pTXB3; führt eine XhoI-Schnittstelle ein, [FW]
CH10	CATGGGATCCTTACTTGGCTTG AACCGCATC	Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ N <sup>AS1-41</sup> /C <sup>AS141-178</sup> kodiert; für die Integration in den Vektor pTXB3; führt eine BamHI-Schnittstelle ein, [RV]
CH11	CCTCTGGCCAGCACGTTTTAC	Primer für inverse PCR zur Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ AS27-41 kodiert; Matrize p123-Pwt-pep1 $\Delta$ 141-178, für <i>blunt end-Ligation</i> , [FW]
CH12	GGCATGGACGGGAACGGT	Primer für inverse PCR zur Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 $\Delta$ AS27-41 kodiert; Matrize p123-Pwt-pep1 $\Delta$ 141-178, für <i>blunt end-Ligation</i> , [RV]
CH14	TGGTTCTCCTCGGCCGAAGTCG GCGTTTGCTAC	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Valinrestes V54 in einen Alaninrest, [FW]
CH15	TCTCCTCGGTCTGAAGCCGGCGT TTGCTACAACC	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Valinrestes V56 in einen Alaninrest, [FW]
CH16	TCGAAGTCGGCGCTTGCTACAA CCCGCAAGCTC	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Valinrestes V58 in einen Alaninrest, [FW]
CH17	CGTTTGCTACAACGCGCAAGCT CGCGTTGGCAGCATC	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Prolinrestes P62 in einen Alaninrest, [FW]
CH20	GAAGTCGGCGTTTCCTACAACC CGCAAGCTCG	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Cysteinrestes C59 in einen Serinrest, [FW]
CH22	CACTGCCGCAAACGTCCGTGG CGCTCAAGCCGCT	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Cysteinrestes C94 in einen Serinrest, [FW]
CH38	TACACACTGGCGCAAACGTGCG TGG	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Prolinrestes P91 in einen Alaninrest, [FW]
CH39	CAAACGTGCGGGCGCTCAAG	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Valinrestes V95 in einen Alaninrest, [FW]
CH40	TACACACTGGCGCAAACGTGCG CGGGCGCTCAAG	Mutagenese von <i>um01987</i> zur Substitution des Prolinrestes P91 sowie des Valinrestes V95 in einen Alaninrest, [FW]

CH41	ACTATGCGGCATCAGAGCAGAT TG	Primer für die Sequenzierung von Genen, die standardmässig in den p123-Vektor inseriert wurden, [FW]
CH43	TTGGATCCTTACATGCCAAACAT GCTACCGATTCC	Amplifizierung von <i>um01987</i> ; für die Integration in den Vektor pET15b, führt eine BamHI-Schnittstelle ein, [RV]
CH46	CGCGGATCCTTACTTGTACAGC TCGTC	Amplifizierung von <i>gfp</i> ; für die Integration in den Vektor pET15b, führt eine BamHI-Schnittstelle ein, [RV]
CH49	GGGAATTCCATATGGATGCTGC GGGTGCGGTACCATTG	Amplifizierung von <i>um01987</i> ohne den für das Signal-Peptid kodierenden Bereich; für die Integration in den Vektor pET15b, führt eine NdeI-Schnittstelle ein, [FW]
CH50	GCTTCGTCCAATGCTCTTGAT CT	Primer für inverse PCR zur Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 <sup>ΔAS27-124</sup> kodiert; Matrize p123-Pwt-Pep1:GFP, für <i>blunt end</i> -Ligation, [FW]
CH51	GGCATGGACGGGAACGGT	Primer für inverse PCR zur Amplifizierung des Bereiches von <i>um01987</i> , welcher für die trunkierte Pep1-Variante Pep1 <sup>ΔAS27-124</sup> kodiert; Matrize p123-Pwt-Pep1:GFP, für <i>blunt end</i> -Ligation, [RV]
CH61	CGATCCCGCGAAATTAATACG	Primer für die Sequenzierung von Genen, die standardmässig in den pET15b-Vektor inseriert wurden, [FW]
CH68	TTCCATGGTGGATGCTGCGGGT GCGGTACCATTG	Amplifizierung von <i>um01987</i> ohne den für das Signal-Peptid kodierenden Bereich; für die Integration in den Vektor pETM-43, führt eine NcoI-Schnittstelle ein, [FW]
CH69	CCCAAGCTTCATGCCAAACATG CTACCGATTCC	Amplifizierung von <i>um01987</i> ; für die Integration in den Vektor pETM-43, führt eine HindIII-Schnittstelle ein, [RV]
CH83	GGAATTCCATATGCGCTCGATC GCCACCGCCAT	Amplifizierung von <i>gfp</i> ; für die Integration in den Vektor pET15b, als Matrize diente der Vektor p123-Pwt-Pep1:GFP; führt eine NdeI-Schnittstelle ein, [FW]
CH75	CCCAAGCTTTGCTGTCCTTCT GGCGA	Amplifizierung des ersten zmPOX12si-Fragments, zur die Integration in den Vektor pB3-3, als Matrize diente cDNA der Maislinie Va35, führt eine HindIII-Schnittstelle ein, [FW]
CH76	CCCAAGCTTCACGTAGTACTTG TTGTC	Amplifizierung des ersten zmPOX12si-Fragments, zur die Integration in den Vektor pB3-3, als Matrize diente cDNA der Maislinie Va35, führt eine HindIII-Schnittstelle ein, [RV]
CH77	CCCAAGCTTACGCCAACGCCT TCGAC	Amplifizierung des zweiten zmPOX12si-Fragments, zur die Integration in den Vektor pB3-3, als Matrize diente cDNA der Maislinie Va35, führt eine HindIII-Schnittstelle ein, [FW]

CH78	CCCAAGCTTCCATCTTGACGTA GGAGT	Amplifizierung des zweiten zmPOX12si-Fragments, zur die Integration in den Vektor pB3-3, als Matrize diene cDNA der Maislinie Va35, führt eine HindIII-Schnittstelle ein, [FW]
CH84	CAGCCTGTGGACATATGC	qRT-Primer zur Detektion von <i>atfp4</i> (NP_001152411.1), [FW]
CH85	GCACATGCCCTTAACCTC	qRT-Primer zur Detektion von <i>atfp4</i> (NP_001152411.1), [RV]
KL81	GGAATCCACGAGACCACATA	qRT-Primer zur Detektion von <i>actin</i> (AY594294), [FW]
KL82	CATTCTATCGGCAATACCTGG	qRT-Primer zur Detektion von <i>actin</i> (AY594294), [RV]
OGU238	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	qRT-Primer zur Detektion von <i>gapdh</i> (NM001111943), [FW]
OGU237	TCCTTGGCTGAGGGTCCGTC	qRT-Primer zur Detektion von <i>gapdh</i> (NM001111943), [RV]
KL39	ATATGGGCTTCCAAGGTCTG	qRT-Primer zur Detektion von RNA1 (DQ530423.1), [FW]
KL40	TCGCGGTCAAACAACATGGC	qRT-Primer zur Detektion von RNA1 (DQ530423.1), [RV]
KL47	TATGGGTCCCTTGACGTTCTC	qRT-Primer zur Detektion von <i>cc9</i> (BN000513.1), [FW]
KL48	GGATCATCCGTAGCCATCTG	qRT-Primer zur Detektion von <i>cc9</i> (BN000513.1), [RV]
KL125	CTGAACAAGTTCTTCGCGG	qRT-Primer zur Detektion von <i>pox12</i> (ACG36543), [FW]
KL126	AGGTCCACGTAGTACTTGTTG	qRT-Primer zur Detektion von <i>pox12</i> (ACG36543), [RV]
KL139	CCGACATCCTCTTCAACTTCTG	qRT-Primer zur Detektion von <i>bbi1</i> (EU955113.1), [FW]
KL140	TTCTCTGAAGCGGCACAC	qRT-Primer zur Detektion von <i>bbi1</i> (EU955113.1), [RV]
OGU241	ACTACGTGGACCCGCACAAC	qRT-Primer zur Detektion von <i>pr1</i> (ZMU82200), [FW]
OGU242	CGGAGTGGATCAGCTTGCAGTC	qRT-Primer zur Detektion von <i>pr1</i> (ZMU82200), [RV]

#### 4.3.4 Plasmide

Die nachfolgend aufgeführten Vektoren wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Wurden Plasmidteile mittels PCR amplifiziert, wurde die Sequenz inserierter DNA-Abschnitte durch Sequenzierungen überprüft. Soweit nicht anderes vermerkt, vermitteln die Plasmide eine Ampicillin-Resistenz.

##### **Plasmide zur Expression von Genen in *E. coli***

###### **pET15b** (Novagen, Madison/USA)

Der Vektor enthält einen T7-Promotor, der von einem *lac*-Operator reguliert wird. Die Expression von Genen unter Kontrolle des T7/*lac*-Promotors kann nur in Stämmen erfolgen, die das Gen1 des Bakteriophagen T7 enthalten, welches für die T7-RNA-Polymerase kodiert. Unter der Kontrolle des Promotors, kann die Expression eingebrachter Gene mittels Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) reguliert werden. Durch die 5'-Ende Fusion an eine Sequenz, welche für einen Hexahistidin-*tag* (*His<sub>6</sub>-tag*) kodiert, ist es möglich, die exprimierten Proteine über das Ni-NTA-System aufzureinigen.

###### **pRSET-GST $\Delta$ His<sub>6</sub>** (erhalten von Prof. M. Groll, TU-München)

Dieser Vektor basierte ursprünglich auf dem von Invitrogen (Karlsruhe) unter dem Namen pRSET vertriebenen Vektor. Im pRSET-GST $\Delta$ His<sub>6</sub> wurde die kodierende Sequenz des Hexahistidin-*tag* (*His<sub>6</sub>-tag*) entfernt und durch einen GST (Glutathion-S-Transferase)-*tag* ersetzt. Durch die 5'-Ende Fusion an eine Sequenz, welche für GST (25,7 kDa) kodiert, ist es möglich, die exprimierten Proteine über das GST-System aufzureinigen. Am 3'-Ende des *gst*-Gens befindet sich eine PreScission<sup>TM</sup>-Protease-Spaltstelle. Dies ermöglicht, bei Bedarf den GST-*tag* vom Fusionsprotein zu trennen. Da die PreScission<sup>TM</sup>-Protease (GE Healthcare, München) selbst über einen GST-*tag* verfügt, verbleibt die Protease nach Elution des Verdau auf der Glutathione Sepharose<sup>TM</sup>-Matrix (GE Healthcare, München). Die Expression des Fusionsproteins erfolgt, analog dem für den pET15b-Vektor beschriebenen, auf einem T7/*lac*-Promotor basierenden System.

**pTXB3** (erhalten von Prof. M. Groll, TU-München)

Dieser Vektor enthält zur 3'-Fusion eines Zielgens ein Gen, welches für ein *Mxe*-Intein/Chitinbinde-Domäne-Konstrukt (CBD) (27 kDa) kodiert. Das Fusionsprotein kann über Chitin-*Beads* aufgereinigt werden. In Gegenwart von Thiolen wird die spezifische Selbstspaltung des (mutierten) Inteins induziert. Hierbei handelt es sich um ein proteinspleißendes Element aus dem *Saccharomyces cerevisiae vma1*-Gen. Intein verbleibt über CBD an der Säule gebunden, so daß das Zielprotein eluiert werden kann. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt, analog dem für den pET15b-Vektor beschriebenen, auf einem T7/*lac*-Promotor basierenden System.

**pETM-43** (EMBL, Heidelberg)

Dieser Vektor enthält zur 5'-Fusion eines Zielgens ein Gen, welches für das Maltose-Binde-Protein (MBP) (40,2 kDa) sowie eine angeschlossene PreScission<sup>TM</sup>-Spaltstelle kodiert. Zusätzlich enthält das Plasmid zur 3'-Fusion eine Sequenz, die für einen Hexahistidin-*tag* (*His*<sub>6</sub>-*tag*) kodiert. Somit kann nach Insertion eines Zielgens das Fusionsprotein sowohl über das pMAL-System als auch über das Ni-NTA-System aufgereinigt werden. Eine anschließende Abspaltung des MBP-*tags* kann über die PreScission<sup>TM</sup>-Protease erfolgen. Die Expression des Fusionsproteins erfolgt, analog dem für den pET15b-Vektor beschriebenen, auf einem T7/*lac*-Promotor basierenden System. Das im Vektor enthaltene Kanamycin-Resistenzgen kann als Selektionsmarker verwendet werden.

**Die Fusion des *pep1*-Gens (*um01987*) zum Zwecke der Überexpression in *E. coli* erfolgte immer ohne die Sequenz, welche für die Signalpeptidregion des Proteins kodiert ( $\Delta$ AS 1-26).**

**pET15b-Pep1** (G. Doehlemann, nicht publiziert)

Dieses Plasmid wurde generiert, um Pep1 in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *pep1*-Gen, am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen *His*<sub>6</sub>-*tag* kodiert.

**pET15b-Pep1 $\Delta$ N/C**

Dieses Plasmid wurde generiert, um eine die trunkierte Pep1 $\Delta$ N/C-Version (Pep1 $\Delta$ AS1-41,  $\Delta$ AS141-178) in *E. coli* zu produzieren. Als Matrize diente das



Plasmid p123-Pwt-Pep1 $\Delta$ N<sup>AS27-41</sup>/C<sup>AS141-178</sup>. Für die Amplifizierung des Gens wurden die Primer CH09 und CH10 verwendet. Das *pep1* $\Delta$ N/C-Gen wurde am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen His<sub>6</sub>-tag kodiert.

#### **pET15b-Pep1<sup>CS59,94</sup>**

Dieses Plasmid wurde generiert, um eine Cystein-mutierte Pep1<sup>CS59,75</sup> in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *pep1*<sup>CS59,75</sup>-Gen, am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen His<sub>6</sub>-tag kodiert. Für die Amplifizierung des Gens wurden die Primer CH43 und CH49 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-pep1-CS<sup>59,75</sup>, welches durch Doehlemann *et al.* (2009) erzeugt wurde. Das Plasmid entstand in Zusammenarbeit mit Sebastian Ziemann im Rahmen der Betreuung seiner Bachelorarbeit.

#### **pET15b-Pep1<sup>VA58,PA62</sup>**

Dieses Plasmid wurde generiert, um eine, im ersten putativen Serinprotease-Inhibitormotiv, mutierte Pep1<sup>VA58,PA62</sup>-Version in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *pep1*<sup>VA58,PA62</sup>-Gen, am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen His<sub>6</sub>-tag kodiert. Für die Amplifizierung des Gens wurden die Primer CH43 und CH49 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-Pep1<sup>VA58,PA62</sup>. Das Plasmid entstand in Zusammenarbeit mit Sebastian Ziemann im Rahmen der Betreuung seiner Bachelorarbeit.

#### **pRSET-GST $\Delta$ His<sub>6</sub>-Pep1 $\Delta$ N/C**

Dieses Plasmid wurde generiert, um eine die trunkierte Pep1 $\Delta$ N/C-Version (Pep1 $\Delta$ AS1-41,  $\Delta$ AS141-178) in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *pep1* $\Delta$ N/C-Gen, am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen GST-tag mit PreScission<sup>TM</sup>-Spaltstelle kodiert. Für die Amplifizierung des Gens wurden die Primer CH03 und CH04 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-Pep1 $\Delta$ N<sup>AS27-41</sup>/C<sup>AS141-178</sup>.

#### **pTXB3-Pep1 $\Delta$ N/C**

Dieses Plasmid wurde generiert, um eine die trunkierte Pep1 $\Delta$ N/C-Version (Pep1 $\Delta$ AS1-41,  $\Delta$ AS141-178) in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *pep1* $\Delta$ N/C-Gen, am 3'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für eine Mxe intein/Chitinbinde-Domäne-Konstrukt kodiert. Für die Amplifizierung des Gens

wurden die Primer CH01 und CH02 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-Pep1 $\Delta$ N<sup>AS27-41</sup>/C<sup>AS141-178</sup>.

### **pETM-43-Pep1**

Dieses Plasmid wurde generiert, um Pep1 in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *pep1*-Gen, am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für das MBP-Protein mit angeschlossener PreScission<sup>TM</sup>-Spaltstelle kodiert. Am 3'-Ende erfolgte zusätzlich die Fusion an die Sequenz, die für einen His<sub>6</sub>-tag kodiert. Für die Amplifizierung des Gens wurden die Primer CH68 und CH69 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid pET15b-Pep1.

### **pET15b-GFP**

Dieses Plasmid wurde generiert, um GFP in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *gfp*-Gen, am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen His<sub>6</sub>-tag kodiert. Für die Amplifizierung des Gens wurden die Primer CH46 und CH83 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt- Pep1:GFP.

## **Plasmide zur Generierung von stabilen *U. maydis* Mutanten**

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide sowie die selbst hergestellten Plasmide beschrieben, die für die Gewinnung stabiler *U. maydis* Mutanten zum Einsatz kamen.

**Die Fusion des *pep1*-Gens zum Zwecke der Komplementation in *U. maydis* erfolgte immer mit der Sequenz, welche für die Signalpeptidregion des Proteins kodierte ( $\Delta$ AS 1-26).**

### **p123** (Aichinger *et al.*, 2003)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators. Für die Transformation von *U. maydis*, kann das Plasmid durch Schnitt (z.B. mit SspI) im *cbx*-Gen, in den *ip*-Lokus inseriert werden.

### **p123-Pwt- Pep1:GFP** (Doehlemann *et al.*, 2009)

Dieses Plasmid enthält das *pep1*-Gen, welches 3'-fusioniert an das *gfp*-Gen, unter der Kontrolle des nativen-Promotors und des *nos*-Terminators exprimiert

wird. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

#### **p123-Pwt-Pep1 $\Delta$ <sup>AS27-41</sup>/C<sup>AS141-178</sup>** (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR unter Verwendung der Primer CH11 und CH12. Als Matrize diente das Plasmid p123- pep1 $\Delta$ 141–178 (Doehlemann *et al.*, 2009), in welchem bereits die kodierenden Basenpaare für die AS 141-178 von Pep1 deletiert waren. Durch die inverse PCR wurden zusätzlich die kodierenden Basenpaare für die AS 27-41 von Pep1 deletiert. Dieses Plasmid enthält das *pep1 $\Delta$ N<sup>AS27-41</sup>/C<sup>AS141-178</sup>*-Gen, das unter der Kontrolle des nativen-Promotors und des *nos*-Terminators exprimiert wird. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

#### **p123-Pwt-Pep1 $\Delta$ <sup>AS27-124</sup>**

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR unter Verwendung der Primer CH51 und CH52. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-Pep1:GFP. Dadurch wurden die kodierenden Basenpaare für die AS 27-124 von Pep1 deletiert. Dieses Plasmid enthält das *pep1 $\Delta$ <sup>AS27-124</sup>*-Gen, das unter der Kontrolle des nativen-Promotors und des *nos*-Terminators exprimiert wird. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

#### **p123-Plasmide mit Punktmutationen in den putativen Serinprotease-Inhibitormotiven von Pep1**

Alle Plasmide entstanden durch Punktmutationen, welche im *pep1*-Gen mittels des QuikChange (Multi) Kit (Stratagene, LaJolla/USA) inseriert wurden. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-Pep1:GFP. Die eingebrachten Substitutionen, welche im ersten – bzw. zweiten putativen Serinprotease-Inhibitormotiv eingebracht wurden, sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für die Mutationen des ersten bzw. zweiten putativen Serinprotease-Inhibitormotives, wurde jeweils eine PCR Reaktion angesetzt, welche jeweils alle entsprechenden Primer zur Mutation des betreffenden Motives als Primer-Mix enthielt. Die Primer wurden dabei im äquimolaren Verhältnis zueinander zugegeben. Nach erfolgreicher Transformation

wurden von den erhaltenen Kolonien jeweils 10-20 Klone ausgewählt und mittels Sequenzierung auf die Insertion von Mutationen geprüft. Alle Plasmide enthalten ein mutiertes *pep1<sup>XX</sup>*-Gen, das unter der Kontrolle des nativen-Promotors und des *nos*-Terminators exprimiert wird. Alle Plasmide können nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

**Tabelle 8. Eingebraachte Substitutionen im ersten- bzw. zweiten putativen Serinprotease-Inhibitormotiv von Pep1.** Mit Ausnahme des Plasmids #244, wurde in allen Fällen durch Alainin substituiert. SZ/CH: Ein Teil der Plasmide wurde in Kooperation mit Sebastian Ziemann, im Rahmen der Betreuung seiner Bachelor-Arbeit hergestellt.

Original Pep1- Sequenz (1. Motiv)	Gesetzte Punktmutationen	Plasmid- Bezeichnung	Stamm- sammlung	Zusammen- arbeit mit S. Ziemann	Mutagenese Primer
			AG GD		
<u>VEVG</u> <u>VCYNP</u>	<b>A</b> EVGVCYNP	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA54</sup>	#284	SZ/CH	CH14
	VE <b>A</b> GVCYNP	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA56</sup>	#286	SZ/CH	CH15
	VEVG <b>A</b> CYNP	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA58</sup>	#280	SZ/CH	CH16
	VEVGVCY <b>A</b>	p123-Pwt-Pep1 <sup>PA62</sup>	#282	SZ/CH	CH17
	<b>A</b> EVG <b>A</b> CY <b>NG</b>	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA54,58,PQ62</sup>	#244		CH14/CH16/ CH17
	VE <b>A</b> G <b>A</b> CYNP	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA56,58</sup>	#245		CH15/CH16
	VEVG <b>A</b> CY <b>A</b>	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA58,PA62</sup>	#243		CH16/CH17
<b>Original Pep1- Sequenz (2. Motiv)</b>					
<u>PQSC</u> <u>V</u>	<b>A</b> QSCV	p123-Pwt-Pep1 <sup>PA91</sup>	#292	SZ/CH	CH40
	PQSC <b>A</b>	p123-Pwt-Pep1 <sup>VA95</sup>	#294	SZ/CH	CH39
	<b>P</b> QSC <b>A</b>	p123-Pwt-Pep1 <sup>PA91,VA95</sup>	#297	SZ/CH	CH38

### p123-Pwt-Pep1<sup>CS59,94</sup>

Dieses Plasmid entstand durch Punktmutationen, welche im *pep1*-gen mittels des QuikChange (Multi) Kit (Stratagene, LaJolla/USA) inseriert wurden. Als Matrize diente das Plasmid p123-Pwt-Pep1:GFP, in welchem die Pep1-Aminosäuren Cystein C59 und C94 jeweils durch Serin substituiert wurden. Als

Mutageneseprimer wurden die durch Doehlemann *et al.* (2009) erstellten Primer CH20 und CH22 verwendet. Dieses Plasmid enthält das *pep1*<sup>CS59,94</sup>-Gen, das unter der Kontrolle des nativen-Promotors und des *nos*-Terminators exprimiert wird. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

### **Plasmide für das Virus-induzierte Gen-silencing**

#### **pB3-3** (Ding *et al.*, 2006)

Enthält die RNA3 des BMV unter der Kontrolle des T3-Promotors. Über eine HindIII-Restriktionsschnittstelle, kann ein *silencing*-Fragment an die 3'-UTR der RNA3 fusioniert werden.

#### **pF1-11** (Ding *et al.*, 2006)

Enthält die RNA1 (DQ530423.1) des BMV unter der Kontrolle des T3-Promotors.

#### **pF2-2** (Ding *et al.*, 2006)

Enthält die RNA2 (DQ530424.1) des BMV unter der Kontrolle des T3-Promotors.

#### **pB3-3-zmPOX12si-Frag1**

Für das *silencing* der Peroxidase-12 aus Mais, wurden zwei *silencing*-Konstrukte erstellt. Zur Amplifizierung von Fragment 1 wurden die Primer CH75 und CH76 verwendet. Als Matrize diente cDNA der Maisvarietät *Zea mays* L. cv Va35. Das 248 bp-große Fragment wurde in *anti-sense* Orientierung an die 3'-UTR der RNA3 des BMV fusioniert.

#### **pB3-3-zmPOX12si-Frag2**

Für das *silencing* der Peroxidase-12 aus Mais, wurden zwei *silencing*-Konstrukte erstellt. Zur Amplifizierung von Fragment 2 wurden die Primer CH77 und CH78 verwendet. Als Matrize diente cDNA der Maisvarietät *Zea mays* L. cv Va35. Das 178 bp-große Fragment wurde in *anti-sense* Orientierung an die 3'-UTR der RNA3 des BMV fusioniert.

#### **pB3-3-YFPsi** (Weber *et al.*, 2003)

Der Vektor enthält ein 164 bp langes Fragment des *yfp*-Gens (AB697058.1). Das Fragment liegt fusioniert in *anti-sense* Orientierung an die 3'-UTR der RNA3 des BMV vor.

## 4.4 Mikrobiologische Standardmethoden

### 4.4.1 Transformation

#### 4.4.1.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ und Top10

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformations-kompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium, dem 10 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 10 mM MgSO<sub>4</sub> zugesetzt wurden, mit 1 ml einer frischen TOP10- bzw. DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 - 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50-100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50  $\mu$ l mit bis zu 10  $\mu$ l Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec. bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz, mit 800  $\mu$ l dYT-Medium versetzt und 30-60 min bei 800 Upm bei 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> *4 H <sub>2</sub> O 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O 15% (v/v) Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> pH 5,8 (Acetat), sterilfiltriert
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O 15% (v/v) Glycerin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> pH 5,8 (NaOH), sterilfiltriert

#### 4.4.1.2 Transformation von *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS

Zur Transformation wurden *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS-Zellen (Novagen/Merck, Darmstadt) auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 5 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 35 sec. bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz für 2 min auf Eis gestellt. Zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz mit 250 µl SOC-Medium (Novagen/Merck, Darmstadt) versetzt und bei 300 Upm bei 37°C für 45-60 min auf einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.4.1.3 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). Von einer auf Platte wachsenden *U. maydis* Kultur wurde eine 4 ml Yeps-*light* - Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C und 200 Upm geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem Yeps-*light* -Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1,0$ ) bei 200 Upm geschüttelt. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugieren bei 3200 Upm für 10 min bei 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert, mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (10-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch Zentrifugation bei 2.300 Upm , für 10 min bei 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang drei mal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

SCS-Lösung

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

---

STC-Lösung		10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
STC/PEG-Lösung		15 ml STC 10 g PEG4000
Regenerations-Agar	Top:	1,5 % (w/v) Bactoagar 1 M Sorbitol in YEPS- <i>light</i>
	Bottom:	wie Top, zusätzlich zweifach konzentriertes Antibiotikum

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerations-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden gewachsene Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert.



## 4.5 Molekularbiologische Methoden

### 4.5.1 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

#### 4.5.1.1 Restriktion von DNA

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ-II-Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt/Main) für 1 - 16 h bei enzymespezifischer Temperatur durchgeführt. Die Menge an eingesetzter DNA variierte dabei zwischen 0,5 und 5 µg. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

X µl DNA (0,5 - 5 µg)  
1,5 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer  
1,5 µl 10 x BSA (NEB)  
0,5 U Restriktionsendonuklease  
add 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.5.1.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem DNA-Fragment verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Dabei wurden für die Ligationen jeweils 50 bis 300 ng der Vektor-DNA verwendet. Bei zwei-Fragment-Ligationen z.B. von PCR-Produkten wurde im molaren Verhältnis von 1:1 ligiert. Die Ligationen wurden in der Regel in einem Volumen von 10-20 µl angesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht im Wasserbad (Julabo, Seelbach) bei 16°C.

#### 4.5.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet (Mullis *et al.*, 1986). Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Zur Amplifizierung von DNA-Längen bis zu 5 kb wurde die Phusion<sup>®</sup> Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn) verwendet. Die KOD Xtreme<sup>™</sup> Polymerase (Merck, Darmstadt) wurde für die inverse PCR auf Plasmide sowie für die Amplifizierung von mehr als 5 kb eingesetzt. Die Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) oder der RedMix (enthält Taq-Polymerase, Bionline, Luckenwalde) wurde für Test-PCRs sowie für die Amplifizierung von DNA-Längen von bis zu 1

kb benutzt. Nachfolgend sind typische Ansätze für die einzelnen Polymerasen beschrieben. Außerdem wird das PCR Programm nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung - [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen - finale Elongation. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase variiert. Die Anlagerungstemperaturen der verwendeten Oligonukleotide wurden *in silico* mittels des Programmes *Clonemanager* 9.0 (Sci-Ed Software, Cary/USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine T-Personal (Biometra, Jena) durchgeführt.

#### **PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase** (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn)

Ansatz: ca. 50 µg Matrizen-DNA  
200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´Strang)  
1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´Strang)  
1 x konzentrierter HF- oder GC-Puffer (Finnzymes)  
0,5 U Phusion-Polymerase

Programm: 98°C/30 s – [98°C/30 s – 55-74°C/15 s – 72°C/10s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

#### **PCR-Ansatz mit KOD Xtreme Polymerase** (Novozym/Merck, Darmstadt)

Ansatz: ca. 50 µg Matrizen-DNA  
200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´Strang)  
1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´Strang)  
1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen)  
1 U KOD-Xtreme Polymerase

Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/15 s – 68°C/1 min/kb] x 30-40 – 68°C/10 min

#### **Taq-Polymerase** (Fermentas, St. Leon-Roth)

Ansatz etwa 50 µg Matrizen-DNA  
250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´Strang)  
1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´Strang)  
1 x konzentrierter KCl-Puffer (Fermentas)  
1 U Taq-DNA-Polymerase

Programm: 94°C/5 min - [94°C/1 min - 55-65°C/1 min - 72°C/1 min/kb] x 35 - 72°C/10 min

**PCR-Ansatz mit RedMix** (Bioline, Luckenwalde)

Ansatz                    1 x konzentrierter RedMix  
                              1,25 µM Primer 1 (bindet am 5´Strang)  
                              1,25 µM Primer 2 (bindet am 3´Strang)  
                              1 µl Zellkultur bzw. 1 Kolonie (Pilze oder Bakterien)

Programm: 94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/20 s – 72°C/30 s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

**4.5.1.4 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuremutagenesen zum gezielten Austausch von einzelnen oder wenigen Basen in Plasmiden mittels PCR mit bis zu drei Primern, die die gewünschten Mutationen enthielten, wurden mit dem QuikChange (Multi) Kit (Stratagene, LaJolla/USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

**4.5.2 Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Plasmide, die die zu sequenzierenden Fragmente enthielten, wurden mittels des Kits „Plasmid Prep QiaPrep Plasmid Prep Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte bei MWG (Martinsried). Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977).

**4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren**

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentrationen der verwendeten Gele variierte zwischen 0,8% und 2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE oder 0,5x TBE durch aufkochen gelöst und anschließend (nach Erkaltung auf ca. 60°C) mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) versetzt. Das Gel wurde in flüssigem Zustand in eine Gelform gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine Gelkammer transferiert und mit dem Puffer, mit dem auch das Gel angesetzt wurde, bedeckt. Das Gel wurde nun auf der Seite der Kathode mit DNA oder RNA in nicht denaturierendem Gelauftragspuffer beladen und bei ca. 5 – 10 V/cm einem elektrischen Feld ausgesetzt. Hierbei wanderte die DNA als poly-Anion, in

Abhängigkeit von Größe und Agarosekonzentration, in Richtung Anode. Sichtbar gemacht wurde die DNA durch UV-Bestrahlung bei 254 nm, bei welcher das interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierte. Die Dokumentation fand mit der Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System, UVP) statt.

5x TBE-Puffer	440 mM Tris-Base 440 mM Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 2 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
6x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)	50% (v/v) Sucrose 0,1% (v/v) Bromphenolblau mit TE-Puffer-Wasser angesetzt

#### 4.5.4 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren (z.B. aus PCR- oder Restriktionsansätzen) wurden mit dem Wizard<sup>®</sup> SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) aus Agarosegelfragmenten nach Herstellerangaben eluiert bzw. aufgereinigt.

#### 4.5.5 Isolierung von Nukleinsäuren

##### 4.5.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA-Präparation wurde mit Puffern der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Pellets in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und durch vortexen gemischt. Zur Zell-Lyse wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben, die Proben durch mehrfaches invertieren gemischt und für 1-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proteine zu fällen und die Lösung zu neutralisieren, wurden 300 µl Puffer P3 hinzupipettiert, durch invertieren gemischt und für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße, in welchen 600 µl Isopropanol zur DNA-Fällung vorgelegt wurde, überführt. Die Mischung wurde invertiert und zur Fällung der DNA für 20 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet mit 500 µl

70% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurde das DNA-Pellet kurz getrocknet und 30-50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert.

Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde nach der Plasmidpreparation zusätzlich mit dem Wizard<sup>®</sup> SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### 4.5.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Diese Methode wurde nach Hoffman und Winston (1987) modifiziert. 2 ml einer in Yeps-*light*-Flüssigmedium angezogenen *U. maydis* Übernachtskultur wurden pelletiert (2 min, 14.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl Ustilago-Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden ca. 0,3 g Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,4-0,6 mm (Sartorius, Göttingen) sowie 400 µl TE-Phenol/Chloroform zugeben. Die Proben wurden für 20 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) bei 2500 Upm geschüttelt und anschließend 15 min zentrifugiert (13.000 Upm; Heraeus Biofuge 15). Nach der Phasentrennung wurden 300 µl der oberen wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (2 min, 14.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer mit 20 g/ml RNase A aufgenommen, bei 55°C für 15 min resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Ustilago-Lysispuffer	50 mM Tris-Cl, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TE-Phenol/Chloroform	Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

#### 4.5.5.3 Gewinnung von RNA aus infiziertem Maisgewebe

Für die Extraktion von RNA aus mit *U. maydis* infiziertem Maisgewebe wurden die infizierten Bereiche (ca. 2 cm) des 3. Blattes 0,5 cm unterhalb der Einstichlöcher geernetet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattstückchen wurden

anschließend zerkleinert, in Eppendorf-Gefäße überführt und mit einem Mörser unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert. RNA wurde dann aus dem Pulver mittels der TRIzol-Extraktionsmethode (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben präpariert. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND 1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific/Fisher Scientific, Schwerte) sowie durch Auftrag einer Probe der RNA auf einem 1 % TAE-Agarosegel.

#### **4.5.6 Southern Analyse**

Zunächst wurde die genomische DNA aus *U. maydis* Transformanden isoliert (vgl. Kapitel 4.5.2.2) und etwa 5 µg der gewonnenen DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Enzyme wurden dabei so gewählt, dass aufgrund des eingebrachten Konstrukts die Anzahl und Größe der entstandenen Fragmente in diesem Locus verändert war. Die restringierte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (TAE-Gel, 1% Agarose, 80 mA) und mit einer nach Southern (1975) modifizierten Methode auf eine Nylonmembran transferiert. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 - 30 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung langsam schwenkend inkubiert. Dies ermöglichte auch den Transfer großer DNA-Fragmente. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH äquilibriert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; GE Healthcare, München) erfolgte über Kapillarkräfte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir durch das Gel hindurch in einen Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden dabei durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Transfer erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 5 h.

##### **4.5.6.1 Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA über DIG-Markierung**

Für den Nachweis von immobilisierter DNA über DIG-Markierung wurden vorwiegend mittels PCR hergestellte DNA-Fragmente mittels DIG High Prime (Roche, Mannheim) gemäß Herstellerprotokolls markiert. Zum Teil wurden die DNA-Sonden auch während der PCR mittels des PCR DIG Labelling Mix (Roche, Mannheim) wiederum nach Herstellerangaben synthetisiert. Die so produzierten Sonden wurden für 10 min bei 99°C im Wasserbad denaturiert und zu 30 ml auf

65°C vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben. Nach halbstündiger Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, Hitze-denaturierte Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens sechs Stunden drehend im Hybridisierungsofen (UVP HB-1000 Hybridizer, Cambridge, UK) bei 65°C. Danach wurden die Membranen zweimal mit Southern-Waschpuffer bei 65°C gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift mit DIG-Waschpuffer für 5 min, wurden die Membranen für 30 min in DIG2-Puffer inkubiert. Dann wurden die Membranen für 30 min mit Antikörperlösung geschwenkt. Der Antikörper ist dabei kovalent an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Um überschüssigen Antikörper von den Membranen zu entfernen, wurde zweimal für je 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min mit DIG3-Puffer äquilibriert, um den für die alkalische Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Deren Substrat CDP Star (Roche, Mannheim) wurde 1:100 in DIG3 verdünnt und für 5 min zu den Membranen gegeben. Danach wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschlagen und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dadurch kann die lichtproduzierende Reaktion aktiviert werden. Die Membranen wurden dann in eine neue Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

1 M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1 - 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Lösung 2 - 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O Lösung 1 in einem Gefäß vorlegen und solange Lösung 2 zugeben, bis pH 7,0 erreicht ist.
Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Southern-Waschpuffer	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

DIG1	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
DIG2	1% (w/v) Milchpulver in DIG1
DIG3	0,1 M Maleinsäure, pH 9,5 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl <sub>2</sub>
DIG-Wasch	0,3% (v/v) Tween-20 in DIG1
CDP-Star-Lösung	100 µl-CDP-Star (Roche, Mannheim) in 10 ml DIG3

#### 4.5.7 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für qRT-PCR sowie VIGS-Experimente wurde mittels des „Superskript III First Strand Synthesis SuperMix“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.5.8 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative real-time PCR (qPCR) wurde RNA aus infiziertem Maisgewebe extrahiert. DNA-Reste in den RNA-Proben wurden mittels des „Turbo DNA-free“ Kits (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt und 0,3-2 µg RNA mittels des „Superskript III First Strand Synthesis SuperMix“ in cDNA revers transkribiert (Invitrogen, Karlsruhe). Die cDNA wurde für qRT-PCR Reaktionen eingesetzt, die mit Hilfe des „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG“ Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Als Referenzfarbstoff wurde Fluorescein (Bio-Rad, München) in einer Konzentration von 20 nM mitgeführt eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem iCycler-System (Bio-Rad, München) unter der Verwendung des folgenden Programmes durchgeführt: 95°C/2 min – [95°C/30 s – 61°C/30 s – 72°C/30 s] x 45. Die Spezifität der Reaktionen anhand der vom Gerät berechneten Schmelzkurve überprüft. Der „Threshold Cycle“ wurde mittels der Bio-Rad Software Version 3.0 ermittelt. Die relativen Expressionswerte wurden mit Hilfe des Programmes Gene Expression Macro (Bio-Rad, München) berechnet.



## 4.6 Proteinbiochemische Methoden

### 4.6.1 Antikörper

#### 4.6.1.1 Kommerziell erworbene Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und HRP-Konjugate, welche zur Durchführung von Western Blot Analysen verwendet wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper und HRP-Konjugate mit eingesetzter Verdünnung und Herstellerangaben.**

Antikörper	Verwendung	Bezug
anti-HA (aus Maus)	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:10.000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-His (aus Maus)	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von His-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:10.000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Pep1 #1 (aus Meerschwein)	Polyklonaler primärer Antikörper aus Meerschwein der zur Detektion des <i>U. maydis</i> Effektors Pep1 diente (Verdünnung 1:10.000).	Eurogentec (Seraing, Belgien)
anti-Maus-HRP (aus Pferd)	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden (Verdünnung 1:10.000).	Cell Signaling Technology (Danver, USA)
anti-Meerschwein-HRP (Kaninchen)	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Meerschweinchen gewonnen wurden (Verdünnung 1:10.000).	Invitrogen (Carlsbad, USA))
Streptavidin-Peroxidase Polymer	Konjugat aus kovalent gebundenem Streptavidin und <i>Horseradish</i> -Peroxidase zur Detektion von Biotin (Verdünnung 1:3.000)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

### 4.6.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) angewandt. Mit dieser Methode ist es möglich denaturierte Proteine nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Zum vollständigen Denaturieren wird die Proteinlösung 5 min bei 99°C mit 1 x SDS-Gelladepuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (50  $\mu$ l/ml) erhitzt. Dabei lagern sich die negativ geladenen SDS-Moleküle an die

Proteine an und verleihen diesen proportional zur Molekülmasse eine negative Ladung. Es wurden vertikale Gele (10,5 x 11,5 x 0,1 cm) verwendet (Mini Protean System, BioRad, München). Diese setzen sich aus Sammel- und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Probe in einer Ebene vor dem Eintritt in das Trenngel, wobei die unterschiedliche Mobilität der Proteine in einem pH-Gradienten genutzt wird. Durch Einsatz entsprechender Kämme (BioRad, München) im Sammelgel werden Taschen erzeugt, in die die gekochte Probe eingefüllt werden kann. Im Trenngel werden die Proteine in der Probe durch ein Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, wobei größere Proteine langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Das Molekularnetz ist bei höherprozentigen Gelen enger, so dass mit diesem kleinere Proteine aufgetrennt werden können. Für die Auftrennung größerer Proteine werden Gele mit geringeren Acryl-/Bis-Acrylamidanteilen verwendet. Als Laufpuffer in der Gelkammer diente SDS-Laufpuffer. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein vorgefärbtes Proteinstandardgemisch (Prestained Protein Marker 15-170 kDa, Fermentas, St. Leon-Roth) bestimmt. Ein typischer Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 120-160 V für ca. 1h.

6 x SDS-Gelladepuffer	1,5 mM Tris-HCl pH 6,8 30 % (w/v) SDS 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 10 % Endkonzentration Glycerin
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 4 mM SDS
Sammelgel	5 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05 % (v/v) TEMED
Trenngel	8 – 10 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05 % (v/v) TEMED

### 4.6.3 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western Blot)

Im Western Blot wurden Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert und auf diesen durch Immundekoration spezifisch detektiert. Für den Transfer der Proteine wurde ein Semi-DryBlot durchgeführt. Verwendet wurden hierzu das Semi-dry Transfer System von Bio-Rad (München) oder das Fastblot-System der Firma Biometra (Göttingen). Bei Verwendung einer PVDF-Membran ist es notwendig, diese vor dem Blot, durch kurzes Benetzen mit Methanol und anschließendes Äquilibrieren in Transferpuffer, zu aktivieren. Für den Blot wurde eine Lage eines 3 mm Whatman-Papier von der Größe einer Membran in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die Membran wird blasenfrees das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer wurde für 60 min bei 50 mA/Gel durchgeführt.

Western-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 10,4
	192 mM Glycin
	5-15% (v/v) Methanol

Die auf die Membranen transferierten Proteine wurden durch spezifische Antikörper detektiert. Dazu wurde die Membran mit Blockierlösung für mindestens eine Stunde inkubiert, kurz mit TBS-T gewaschen und dann für 1-16 h bei 4°C oder 1-2 h bei RT mit Antikörperlösung, die den primären Antikörper enthielt, geschwenkt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und danach mit TBS-T, welches den sekundären Antikörper enthielt, für eine Stunde bei RT inkubiert. In dieser Arbeit wurden ausnahmslos Meerrettich-Peroxidase- (HRP; „Horseradish-Peroxidase“) Konjugate als sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-T wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran für fünf Minuten mit ECL Plus Western Blot detection reagent (GE Healthcare, München) inkubiert wurde. Die Membranen wurden dann in eine Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

TBS-T	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween20
Blockierlösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T
Antikörperlösung	Antikörper verdünnt in 1 % (w/v) Milchpulver in TBS-T

#### 4.6.4 Far-Western Blot

Die heterolog exprimierten Proteine His<sub>6</sub>-Pep1 und His<sub>6</sub>-GFP wurden mittels Ni-NTA aufgereinigt. Die Proteinproben wurden standardmässig mit 10 mM DTT in SDS-Gelladepuffer aufgenommen und für 5 min gekocht. 25, 15 und 7,5 µg total-Protein wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran für 45 min in Blockierlösung bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran 5 mal mit TBS-T gewaschen und mit 25 µM *Horseradish*-Peroxidase (HRP) in TBS-T ÜN bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut 5 mal mit TBS-T gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte mittels Chemiluminescence mittels des ECL Plus Western Blot detection reagent (GE Healthcare, München).

#### 4.6.5 Coomassie-Proteinfärbung

Zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde die PageBlue Proteinfärbelösung (Fermentas, Vilnius, Litauen) nach Herstellerangaben verwendet. Die auf dem Coomassie Brilliant Blue R250 basierende Colloid-Coomassielösung ermöglicht die Detektion von Proteine im SDS-Gel oder auf PVDF-Membranen bis zu einer Nachweisgrenze von 5 ng. Die Entfärbung von Gelen und Membranen erfolgt durch waschen in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>.

#### 4.6.6 Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die heterologe Expression wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta-gami(DE3)pLysS ausgewählt, um insbesondere die für die Pep1-Expression gewünschte Disulfidbrückenbildung zu unterstützen. Die für die Transformationen verwendeten

Plasmide, die daraus resultierende Stämme sowie die Induktionsbedingungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10: Inkubationsbedingungen zur Expression verschiedener Pep1-Derivate/Fusionen sowie von GFP.**

Plasmid	Stamm	IPTG [μM]	Glucose [w/v]	Inkubationszeit [h]	Inkubations-Temperatur [°C]
pET15b-Pep1	RG-His-Pep1	400	1 %	4	28
pET15b-Pep1ΔN/C	RG-His-Pep1ΔN/C	400	1 %	4	28
pET15b-Pep1 <sup>CS59,94</sup>	RG-His-Pep1 <sup>CS59,94</sup>	400	1 %	4	28
pRSET-GSTΔHis <sub>6</sub> -Pep1ΔN/C	RG-GST-Pep1	100	5 %	72	12
pTXB3-Pep1ΔN/C	RG-Pep1-CBD	400	1 %	2	37
pETM-43-Pep1	RG-MBP-Pep1	400	1 %	4	28
pET15b-GFP	RG-His-GFP	200	/	4	28
pET15b-Pep1 <sup>VA58,PA62</sup>	RG-His-Pep1 <sup>VA58,PA62</sup>	400	1 %	4	28

Vom jeweiligen Expressionsstamm wurde eine ÜN-Vorkultur unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika sowie von 2 % Glucose angesetzt, um eine ungewünschte Induktion der genomkodierte T7-Polymerase zu unterdrücken. Die Inkuabtion erfolgte ÜN bei 37°C und 200 Upm. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur 1:100, meist in einem Volumen zwischen 800 und 1600 ml, verdünnt. Die daraus resultierende Hauptkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> nm von 0,6 – 0,8 angezogen. Zur Induktion der genomkodierte T7-RNA-Polymerase wurde anschließend die entsprechende Menge IPTG zugegeben. Da in allen Plasmiden die Zielgene unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, kommt es zur Induktion der Proteinexpression. Nach der entsprechenden Induktionszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 Upm und 4°C für 20 min (*SORVALL®-RC5B plus, Du Pont, Wilmington, USA*) geerntet und bei -20°C gelagert.

Zur Analyse der Produktion und Löslichkeit des Zielproteins wurden die geernteten Zellen nach Angaben des „QIAexpressionist“ Protokolls (Qiagen, Hilden) behandelt (Protokoll 6: „Determination of target protein solubility“). Aliquots vom Gesamtzellextrakt, der unlöslichen Zelltrümmerfraktion sowie des löslichen Proteinrohextrakts mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 99°C gekocht und mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein des Zielproteins hin analysiert.

Nachdem die für das jeweilige Zielprotein optimalen Expressionsbedingungen bestimmt wurden, erfolgte die Aufreinigung der Proteine in Abhängigkeit des jeweils am Zielprotein fusionierten *tags*.

#### 4.6.7 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Die N- oder C-terminale Fusion eines Hexahistidin ( $\text{His}_6$ )-tags an rekombinant exprimierte Proteine, ermöglicht die Affinitätsreinigung, basierend auf der Chelatisierung immobilisierter  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen auf Ni-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Säulenmaterial, durch die Imidazoliumgruppen des  $\text{His}_6$ -tags. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des „QIAexpressionist“ Protokolls (Qiagen, Hilden, Protokoll 14: „Protein minipreps of 6xHis-tagged proteins from E. coli under native conditions“) mit leichten Modifikationen.

Nach der heterologen Expression wurden die bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerten Zell-Pellets der Rosetta-gami(DE3)pLysS-Stämme auf Eis aufgetaut und in Lyse-Puffer resuspendiert. Zur Zell-Lyse wurden die Zellen für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Lysat in einer Rosettenzelle (Kobe, Marburg) 5 mal für 30 sec. bei 270 W und  $4^\circ\text{C}$  sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat bei 15.000 Upm für 20 min, bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert (SORVALL<sup>®</sup>-RC5B plus, Du Pont, Wilmington, USA). Parallel wurde eine Gravitationsdurchfluss-Säule mit einem Bettvolumen von 1,5 ml der Ni-NTA-Matrix (Ni-Sepharose<sup>™</sup> 6 Fast-Flow, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) beladen und mit Bindepuffer äquilibriert. Der Überstand des zentrifugierten Lysats wurde auf der Ni-NTA-Säule für 45 min auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, *Steinfurt*) bei 10 Upm und  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurde die Säule geöffnet und die ungebundenen Proteine, welche sich im Durchfluss befanden, verworfen. Anschließend wurde die Ni-NTA-Matrix mit 20 bis 25 Bettvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution der an der Ni-NTA-Matrix gebundenen Proteine erfolgte mittels Elutionspuffer in 3 Elutionsschritten zu je 840  $\mu\text{l}$  ( $\Sigma \sim 2,5$  ml Eluat). Für weiterführende Experimente wurde der Puffer mittels illustra-Nap<sup>™</sup>25-Säulen (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) gewechselt. Dazu wurde die Nap25-Säule mit Lagerungspuffer äquilibriert, die 2,5 ml Eluat aufgetragen und mit 3,5 ml Lagerungspuffer eluiert. Sofern gewünscht, wurden die Eluate mittels Amicon Ultra tubes (Milipore, Tullagreen, Irland) nach Herstellerangaben konzentriert. Für eine längerfristige Lagerung, wurde das Eluat

mit 10 % (w/v) Glycerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt. Von den verschiedenen Aufreinigungsschritten wurde jeweils Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Proteinkonzentrationen wurde mittels des Bradford-Assays bestimmt.

Bindepuffer	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 7.9 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lysepuffer	1x Bindepuffer mit 500 µg/mL Lysozyme (Merck, Darmstadt) 0.1 % Triton X-100
Waschpuffer	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 60 mM Imidazol pH 7.9 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7.9 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lagerungspuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

#### 4.6.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung löslicher Proteine in Proteinextrakten und Fraktionen gereinigten Proteins wurden mit Hilfe der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

#### 4.6.9 *In vitro* Peroxidase-Aktivitätsmessungen

Mittels Diaminobenzidin (DAB)-Färbung wurde *in vitro* die Aktivität von Peroxidasen in klaren 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) bestimmt. Zur Analyse der *Horseradish*-Peroxidaseaktivität, wurden 2,7 mM DAB (Sigma, Taufkirchen) und 0,375 U/ml HRP in 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,5 oder 7,5) in einem Volumen von 150 µl aufgenommen. Soweit nötig, wurde mit aufgereinigtem Protein oder einer entsprechenden Pufferkontrolle für 5 min vorinkubiert. Die DAB-Präzipitation wurde durch Zugabe

von 2 µl einer 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung initiiert. Nach 10 min wurde die Mikrotiterplatte mit einem Epson V700 Photo Flachbettscanner (Seiko Epson Inc., Tokyo, Japan) gescannt und die Farbintensitäten mittels Adobe Photoshop CS2 V. 9.02 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) wie folgt bestimmt: Das Bild wurde in Graustufen konvertiert und die Farben invertiert. Anschließend wurden die durchschnittlichen Graustufen eines jeden *Wells* mit dem „Histogram Tool“ bestimmt. Als Referenzwerte dienten nur mit Puffer gefüllte ungefärbte *Wells*. Um den Hintergrund herauszurechnen, wurden die Referenzwerte von den Probenwerten subtrahiert.

Die Peroxidase-Aktivität in apoplastischem Maisfluid wurde analog zum HRP-Assay mittels DAB-Färbung analysiert. Dazu wurden 2,7 mM DAB, 2 µl des apoplastischen Fluids (Proteingehalt 0,5 mg/ml), in 100 µl eines 50 mM Trispuffer, pH 7,5 aufgenommen. Durch Zugabe von 2 µl einer 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde die DAB-Präzipitation initiiert. Vorinkubation und Auswertung der Färbung erfolgten wie oben beschrieben.

#### **4.6.10 Aktivitäts-basiertes Protein-profiling**

##### **4.6.10.1 Verwendetes Blattmaterial**

Maispflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen und nach 7 Tagen entweder mit *U. maydis* SG200 (OD<sub>600</sub> = 3,0) infiziert oder mit Salicylsäure (SA) infiltriert. Die Ernte der mit SG200-infizierten Pflanzen erfolgte 3 Tage nach der Infektion. Dabei wurden nur die infizierten Blattbereiche abgeschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die SA-infiltrierten Blattbereiche wurden nach 2 Tagen abgeschnitten, ebenfalls schockgefroren und bei -80°C gelagert.

##### **4.6.10.2 Aktivitätsbasierte Fluoreszenzmarkierung von Serinhydrolasen**

Zur Analyse der Serinhydrolase-Aktivität in Mais-Blattextrakten wurde die Sonde Fluorophosphonate-Rhodamine (FP-Rh) verwendet (Kaschani *et al.*, 2009a). Zur Herstellung der Blattextrakte wurden ca. 300 mg der jeweiligen Blattproben verwendet. Diese wurden in 600 µl eines 400 mM Boratpuffer pH 8,0 in einem Eppendorf-Cup zermahlen. Die Zelltrümmer wurden für 2 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Um den Puffer zu wechseln, wurden 500µl des Überstandes auf



eine mit PBS äquilibrierte illustra NAP™-5-Säule (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) gegeben und mit 1 ml PBS eluiert. Da die im Boratpuffer enthaltenen Boratanionen, mit phenolischen Substanzen des Pflanzenextraktes einen Komplex bilden, konnten diese somit vom Proteinextrakt getrennt werden. Dies war notwendig, da aufgrund der Sensitivität der Methode, die im Maisextrakt enthaltenen phenolische Substanzen die Signaldetektion störten. Die Pflanzenextrakte wurden auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml eingestellt. Der Proteingehalt im Assay wurde auf 500 µg/ml eingestellt. Das Assayvolumen betrug 50 µl. Soweit erforderlich wurde heterolog exprimiertes, mittels Ni-NTA aufgereinigtes Pep1 zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die FP-Rh-Sonde in einer Konzentration von 2 µM zugeben und für 1 h abgedunkelt bei RT auf einem Drehinkubator inkubiert. Danach wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 15 µl 4x SDS-Probenpuffer und 7 µl 100 mM DTT abgebrochen. Die Proben wurden für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend durch SDS-Gelelektrophorese in einem 12 %-SDS-Gel aufgetrennt. Die Signaldetektion erfolgte im SDS-Gel mittels eines Hitachi FMBio IIe Flachbett Laser-Scanner (MiraiBio, San Francisco, USA).

#### **4.6.10.3 Aktivitätsbasierte Markierung von Cysteinproteasen**

Zur Analyse der Aktivität von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen in Mais-Blattextrakten wurde die Sonde DCG-04 verwendet (Greenbaum *et al.*, 2000). Diese ist ein biotinyliertes Derivat des Cysteinprotease-Inhibitors E-64 und bindet kovalent am Cystein des aktiven Zentrums von Cysteinproteasen. Über den biotinylierten Rest können markierte Cysteinproteasen mittels Western Blot detektiert werden.

Zur Herstellung der Blattextrakte, wurden ca. 100 mg jeder Blattprobe in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> mit 1 mM DTT in einem Eppendorf-Cup zermahlen. Die Zelltrümmer wurden für 2 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und der Proteingehalt auf 1 mg/ml eingestellt. Der Proteingehalt im Assay wurde auf 200 µg/ml eingestellt. Das Assayvolumen betrug 500 µl. Soweit erforderlich wurde heterolog exprimiertes, mittels Ni-NTA aufgereinigtes Pep1 zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die DCG-04-Sonde in einer Konzentration von 2 µM zugeben und für 1 h bei RT auf einem Drehinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe

eiskalten Acetons für mindestens 30 min oder ÜN bei -20°C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm pelletiert. Das Proteinpellet wurde anschließend mit 70 % Aceton gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Probenpuffer mit 200 mM DTT resuspendiert und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden standardmässig in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF oder Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blockierung der Membran erfolgte in entfettetem TBS-BSA für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran für 1-3 h mit dem Streptavidin-Peroxidase Konjugat inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mittels des ECL Plus Western Blot detection reagent (GE Healthcare, München).

#### Entfettung von BSA

BSA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), wird in einem Becherglas mit 100 % Aceton gemischt und abgedeckt für ca. 30 min gerührt. Dabei löst sich anhaftendes Fett im Aceton. Durch einen Faltenfilter wird das BSA vom gelblich gefärbten Aceton/Fett-Gemisch getrennt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis sich das Aceton nicht mehr gelblich verfärbt. Anschließend wird das BSA unter einem Abzug getrocknet und das Pulver bei 4°C gelagert.

TBS-BSA

50 mM Tris/HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl  
3% (w/v) entfettetes BSA

## 4.7 Pflanzenmethoden

### 4.7.1 *Zea mays*

#### 4.7.1.1 Maisvarietäten (*Zea mays* sp.)

Für Infektionsversuche wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam verwendet (Olds Seeds, Madison/USA). Für die VIGS-Experimente wurde die Maisvarietät Va35 verwendet, welche uns freundlicher Weise von M.J. Millard vom *Maize Genetics Cooperation Stock Center* zur Verfügung gestellt wurde.

#### 4.7.1.2 Kultivierung von *Z. mays*

Die Maispflanzen wurden in einem Gewächshaus kultiviert. Die Nachtphase mit 20°C und 60% Luftfeuchte dauerte 9 h, die Tagphase mit 28°C und 40 % Luftfeuchte 15 h, wobei 2,5 h auf die Simulation des Sonnenaufgangs und 3,5 h für die Simulation des Sonnenuntergangs entfielen („ramping“). Die Beleuchtungsintensität betrug während der Tagphase mindestens 28.000 Lux (bei zusätzlicher Sonneneinstrahlung bis zu 90.000 Lux). Jeweils vier Maiskörner wurden in Frühlings-torfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert.

Für die VIGS-Experimente wurde *Zea mays* L. cv Va35 (Ding *et al.*, 2006) unter Gewächshausbedingungen angezogen. Nach 6 Tagen wurden die Pflanzen in Conviron-Phytokammern (Winnipeg, Kanada) überführt. Die Tagphase mit 28°C und 60 % Luftfeuchte dauerte 14,5 h, die Nachtphase mit 22°C und 40 % Luftfeuchte dauerte 9,5 h. Während der Tagphase wurde mit 28.000 Lux beleuchtet.

#### 4.7.1.3 Infektion von *Z. mays* mit *U. maydis*

Die zu infizierenden Stämme wurden vorher über Nacht in Yeps-light-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6-0,8 angezogen. Dann wurde die Kultur geerntet (3.500 Upm, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und in sterilem Wasser resuspendiert, so dass eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 erreicht wurde. Bei Standard-"Spritzinfektionen" wurden 200 bis 500 µl dieser *U. maydis* Suspensionen in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam gespritzt. Die Injektionsstelle wurde etwa 1 cm über der Erde gewählt, also etwa 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen

Pflanzenmeristems. Dabei werden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstochen.

#### 4.7.1.4 Quantifizierung von *U. maydis* Infektionen

Für die Quantifizierung von Pathogenitätssymptomen nach Infektionen von *Z. mays* mit *U. maydis* wurden jeweils 6 und 12 Tage nach Infektion die Symptome nach den folgenden Kriterien (Tabelle 11) klassifiziert. Die Pathogenität von Mutanten wurde aus in mindestens drei unabhängigen Infektionen von ungefähr 40 Pflanzen gewonnenen Werten gemittelt (vgl. Kämper *et al.*, 2006).

**Tabelle 11: Klassifizierung der Symptome von Maispflanzen nach Infektion mit *U. maydis*.**

Pflanzensymptom	Beschreibung
Nekrosen	Blätter zeigen leichte nekrotische Läsionen, keine weiteren Symptome sichtbar
Chlorosen	Pflanze zeigt gelblich-bleiche Verfärbungen an infizierten Blättern
Ligula Schwellung	Pflanze zeigt leichte Schwellungen der Ligula
Kleine Tumore	Die größten Tumore der Pflanze sind < 1 mm
Große Tumore	Die Tumore der Pflanze sind > 1 mm
Tumor-induzierte Biegung der Sprossachse	Sehr starke Tumorbildung, die mit einer Verkrümmung der Sprossachse einhergeht
Tote Pflanze	Die Pflanze ist aufgrund der Infektion gestorben

#### 4.7.2 Salicylsäure-Infiltration von Maisblättern

Infiltriert wurde ausschließlich das dritte Blatt von sieben Tage alten Maispflanzen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser, wurde die Salicylsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zunächst in 100 % EtOH gelöst (200 mM stock) und anschließend 1:100 mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> verdünnt. Danach wurden die Pflanzen mit der 2 mM Salicylsäure-Lösung infiltriert. Dazu wurde von der Blattunterseite her, mit einer 1 ml Spritze ohne Nadel, unter leichtem Druck die Flüssigkeit ins Blatt gedrückt. Um später nur die infiltrierten Blattbereiche ausschneiden zu können, wurden diese mit einem Textmarker markiert.

### 4.7.3 Isolation und Fraktionierung von apoplastischem Maisfluid

Für die Präparation von apoplastischem Maisfluid wurden ausschließlich mit Salicylsäure-infiltrierte Blätter verwendet (vgl. 2.7.2). Dazu wurden die infiltrierte Blattbereiche mit gerader Schnittkante horizontal abgeschnitten. Anschließend wurde das Blattmaterial in einer Vakuumkammer 3-5 mal für je 15 min bei 400 mbar, unter  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  evakuiert. Danach wurden die evakuierten Blattabschnitte gestapelt und mit der Schnittkante nach unten in eine 50 ml Spritze gepackt. Die Spritze wurde mit der kleinen Öffnung nach unten in ein 50 ml Falcon gesteckt. Durch Zentrifugation für 20 min bei 2000 g und 4 °C, wurde das apoplastische Maisfluid aus den Blättern gedrückt und im Falcon aufgefangen. Auf diese Weise erhielt man aus ca. 300 Töpfen mit je 4 Maispflanzen ca. 10 ml Fluid, welches bei -20°C gelagert werden konnte. Zur Fraktionierung mittels Anionenaustausch-Chromatographie wurde das apoplastische Maisfluid auf Eis aufgetaut und der Proteingehalt mittels Bradford-Analyse bestimmt. Pro Lauf wurden 5 mg/ml Protein des Fluids auf eine, mit 20 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0) äquilibrierte, 1 ml MonoQ-Resin-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben. Die Säule wurde 2 mal mit 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,0 gewaschen. Der Durchfluss sowie die Waschschrte wurden in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Anschließend erfolgte die Elution der Proteine in einem linearen NaCl Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,0. Die Eluate wurden jeweils in 500 µl Fraktionen in einem Gesamtvolumen von 20 ml gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml eines Na-Phosphatpuffer pH 6,0, mit 1 M NaCl gewaschen und die Waschschrte in 1 ml Fraktionen aufgefangen.

### 4.7.4 Protease-Aktivitätstests in apoplastischem Maisfluid

Die Proteaseaktivität von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen wurde in, mittels Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniertem apoplastischem Fluid (vgl. 4.7.3) durch Verwendung des fluoreszierenden Substrates Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC, Sigma-Aldrich, Steinheim) bestimmt. Dieses Substrat wird spezifisch durch Cysteinproteasen gespalten. Dabei kommt es zur Freisetzung einer fluoreszierende Gruppe, deren Fluoreszenz bei 460 nm detektiert werden kann (Zimmerman *et al.*, 1976). Zur Bestimmung der Cystein-

protease-Aktivität in fraktioniertem apoplastischen Fluid, wurden 10 µl der jeweiligen Fraktion mit 80 µl Assaypuffer gemischt. Falls gewünscht, wurde dem Puffer E-64 (Sigma-Aldrich, Steinheim) oder aufgereinigtes Pep1 zugegeben und für 10 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 µl eines 100 µM Z-Phe-Arg-AMC-stocks die Fluoreszenzreakion gestartet.

Die Messung erfolgte in einem Fluorimeter (Tecan, Männedorf) über einen Zeitraum von 10 min. War die Proteaseaktivität zu hoch, wurden die Fraktionen zum Teil 1:10 verdünnt.

Assaypuffer	10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 mM DTT
-------------	---

#### **4.7.5 Tabak**

##### **4.7.5.1 Tabakvarietäten (*Nicotiana sp.*)**

Für die Herstellung von Brome-Mosaik-Virus (BMV), als Grundlage für weiterführende VIGS-Experimente (vgl. 4.7.6), wurde ausschließlich die Varietät *Nicotiana benthamiana*, die freundlicherweise von der AG Batschauer (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.

##### **4.7.5.2 Kultivierung von *N. benthamiana***

Tabakpflanzen der Spezies *N. benthamiana* wurden in einem Gewächshaus wie für *Z. mays* beschrieben bei 28°C angezogen. Für die Herstellung von BMV, als Grundlage für weiterführende VIGS-Experimente wurden die Pflanzen in eine Conviron-Phytokammer (Winnipeg, Kanada) überführt. Die Tagphase dauerte 14,5 h und die Temperatur betrug 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Nachtphase dauerte 9,5 h, die Temp. betrug 20°C und die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 40 %. Die Beleuchtung betrug während der Tagphase 26.000 Lux.

#### **4.7.6 Virus-induziertes-Gen-silencing**

Die VIGS-Experimente wurden mittels des Brom-Mosaik-Virus (BMV) nach van der Linde *et al.* (2011) durchgeführt.

#### 4.7.6.1 Herstellung der BMV-RNA

Um die BMV-RNA1, RNA2 und die verschiedenen RNA3-Fusionen zu erhalten, wurden die Plasmide pF1-1, pF2-2, pB3-3-zmPOX12si-Frag1, pB3-3-zmPOX12si-Frag2 und pB3-3-YFPsi individuell verdaut. Alle pB3-3-Konstrukte sowie der Vektor pF2-2 wurden mit PshAI (NEB, Frankfurt/Main) verdaut. Der Vektor pF1-1 wurde mit SpeI (NEB, Frankfurt/Main) verdaut. Pro Verdau wurden 3 µg Plasmid-DNA mit 1,5 µl des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Volumen von 50 µl für 1,5 h bei 37°C verdaut. Anschließend wurde der Verdau mittels des Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) aufgereinigt und in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> eluiert. Mittels eines Vakuumverdampfers wurde das Volumen des Eluats auf ca. 2 µl eingengt. Danach erfolgte unter Verwendung des mMessage-mMachine Kit (Ambion, Darmstadt) die *in vitro* Transkription der verschiedenen RNA's nach Hersteller-Angaben. Anschließend wurde 1 ml des Reaktionsvolumens auf ein 1% TAE-Gel aufgetragen und die Integrität der RNA überprüft.

#### 4.7.6.2 Brom-Mosaik-Virus-Produktion in Tabak

Die Infektion erfolgte nach der Methode von Ding *et al.* (2007). RNA1, RNA2 und die verschiedenen RNA3 wurden äquimolar gemischt. Auf Blätter von ca. 5 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen wurde mit Hilfe eines Pinsels Carborundum (400 mesh Silicon Carbide, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aufgetragen und ca. 10-20 µl des RNA-Mix vorsichtig in die Blattoberfläche einmassiert. Anschließend wuchsen die Pflanzen zur BMV-Produktion für 7 Tage in der Phytokammer. Zur Ernte wurden die infizierten Blätter abgeschnitten und in 100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0 (1:10, w/v) zu einem Extrakt gemörsert. Der BMV-Titer im Extrakt wurde mittels qRT-PCR mit Primern, welche spezifisch am Minus-Strang der RNA1 binden (KL39 und KL40) quantifiziert. Als Referenz wurden Primer welche an mRNA von Aktin binden mitgeführt (KL81 und KL82). Die Extrakte wurden bei -20°C gelagert.

#### 4.7.6.3 Infektion von Mais mit dem Brom-Mosaik-Virus

Alle *N. benthamiana*-Extrakte wurden durch Zugabe von 100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,0 auf einen Virustiter von 2000 REU im Vergleich zu unbehandelten Blättern eingestellt. Da die Expression des *yfp*-kodierenden BMV

unter 2000 REU lag, wurde mir freundlicherweise von Karina van der Linde Extrakt mit einem ausreichenden Virustiter für die YFPsi-Kontrollinfektionen zur Verfügung gestellt. Für Mais-Infektionen wurde jeweils das zweite Blatt, 6 Tage alter Va35-Maispflanzen mit Hilfe eines Pinsel mit Carborundum (400 mesh Silicon Carbide, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) bestrichen und ca. 50 µl des *N. benthamiana*-Extrakts vorsichtig in die Blattoberfläche einmassiert. 11 Tage nach der BMV-Infektion wurden die Pflanzen mit SG200Δ*pep1rfp* infiziert. 2 Tage nach der Infektion wurden Blattproben geerntet. Dazu wurden die 1-3 cm langen infizierten Bereiche, ca. 1 cm unter der Einstichstelle, des sechsten Blattes ausgeschnitten und diagonal geteilt. Ein Teil des Blattabschnitts wurde, für weiterführende qRT-Experimente zur Bestimmung der POX12-silencing-Effizienz, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Der andere Teil des Blattes wurde für die mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufes mit Anilinblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt.

#### **4.7.6.4 Bestimmung der POX12-silencing-Effizienz**

Nach der mikroskopischen Analyse einer der Blatthälften des sechsten Blattes einer POX12si-Pflanze, wurden von den Pflanzen, auf welchen der *U. maydis* Stamm SG200Δ*pep1rfp* Penetrationen zeigte auf POX12-silencing überprüft. Die Silencing-Effizienz wurde mittels quantitativer realtime-PCR (vgl. 4.5.8) überprüft. Insgesamt wurden acht POX12si-Pflanzen analysiert. Als Kontrolle wurden sieben mit SG200Δ*pep1rfp*-infizierte YFP-Pflanzen mitgeführt. Zur Daten-Normalisierung wurde die relative Menge an GAPDH-mRNA bestimmt.

#### **4.7.7 Mikroskopie und Bildverarbeitung**

Die zellmorphologischen Betrachtungen von *U. maydis* erfolgten vorwiegend an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Aperatur verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgenden Anregungs- und Emissionsspektren eingesetzt: DAPI, 365 nm und >397 nm; GFP, 450-490 nm und 515-565 nm. Digitale Aufnahmen einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742,



Hamamatsu) wurden mit den Programmen MetaMorph (Version 6.2r6) bearbeitet. Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs- sowie Emissionswellenlängen und der entsprechende dafür verwendete Laser sind für die verschiedenen Anwendungen in der Tabelle 12 dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgt vorwiegend mit zugehörigen LEICA Software (LAS AF; „Leica application suite“). DAB-Färbungen wurden zudem mit einer hochauflösenden Farbkamera visualisiert (DFC 500).

**Tabelle 12: Für die unterschiedlichen Anwendungen verwendete Laser und die detektierten Emissionswellenlängen.**

Lasertyp	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
Argon Laser	488 nm	495 - 530 nm	GFP
405 Diode	405 nm	415 - 460 nm	Zellwand-Autofluoreszenz, Anilinblau

#### 4.7.7.1 Anilinblau-Färbung

Zur Färbung von Callose wurden die Blätter mit Anilinblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) behandelt. Dazu wurden die Blattstücke von 1-2 cm Länge zweimal mit 50% EtOH gewaschen. Anschließend folgen zwei Waschschrte mit 100 mM Na-Phosphatepuffer, pH 9,0. Dann wurden die Blattabschnitte in 0,05 % (w/v) Anilinblau bei RT in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte die konfokale Mikroskopie im Hintergrund der Färbelösung.

#### 4.7.8 Bioinformatische Analysen

Nukleotidsequenzen wurden der Datenbank GenBank, dem „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) entnommen. Unter <http://expasy.org>, dem „ExPASy Molecular Biology Server“, wurden Aminosäuresequenzen abgerufen. Auch ein BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) Programm wird hier zur Verfügung gestellt. Domänenanalysen wurden mit dem Programm SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) durchgeführt (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Proteine wurden mittels der Programme SignalP ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)), und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) auf eine N-terminale Signalsequenz bzw. anderweitige Lokalisierungssequenzen hin analysiert. Aminosäuresequenzvergleiche wurden mit dem Programm Clonemanager 9.0 mit der Methode

Sequence Assembly, FastScan Method erstellt. Zur Analyse von siRNA-Bildung und der Vorhersage der *silencing*-Spezifität von Maissequenzen wurde das Programm siRNA SCAN (<http://bioinfo2.noble.org/RNAiScan.htm>) verwendet. Die Vorhersagen basierten auf der Mais-tgi v16 Datenbank, welche vom J. Craig Venter Institut zur Verfügung gestellt wurde.

## 5 Literatur

- Abraham, D.J., and Leo, A.J.** (1987). Extension of the fragment method to calculate amino acid zwitterion and side chain partition coefficients. *Proteins* **2**, 130-152.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W., and Kahmann, R.** (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol Genet Genomics* **270**, 303-314.
- Allore, R.J., and Barber, B.H.** (1984). A Recommendation for Visualizing Disulfide Bonding by One-Dimensional Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. *Anal Biochem* **137**, 523-527.
- Almagro, L., Gomez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barcelo, A., and Pedreno, M.A.** (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* **60**, 377-390.
- Alvarez, S., Goodger, J.Q., Marsh, E.L., Chen, S., Asirvatham, V.S., and Schachtman, D.P.** (2006). Characterization of the maize xylem sap proteome. *J Proteome Res* **5**, 963-972.
- Apel, K., and Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.
- Apostol, I., Heinstein, P.F., and Low, P.S.** (1989). Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells: Role in Defense and Signal Transduction. *Plant physiol* **90**, 109-116.
- Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Pritchard, L., Bos, J.I., Venter, E., Avrova, A.O., Rehmany, A.P., Böhme, U., Brooks, K., Cherevach, I., Hamlin, N., White, B., Fraser, A., Lord, A., Quail, M.A., Churcher, C., Hall, N., Berriman, M., Huang, S., Kamoun, S., Beynon, J.L., and Birch, P.R.** (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *P Natl Acad Sci USA* **102**, 7766-7771.
- Arolas, J.L., and Ventura, S.** (2011). Protease Inhibitors as Models for the Study of Oxidative Folding. *Antioxid Redox Signal* **14**, 97-112.
- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**, 973-979.
- Baker, C.J., and Orlandi, E.W.** (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**, 299-321.
- Bakkeren, G., Kämper, J., and Schirawski, J.** (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol* **45**, S15-21.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Gen* **29**, 179-208.
- Banuett, F., and Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Beckers, G.J.M., and Spoel, S.H.** (2006). Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**, 1-10.
- Beers, E.P., Jones, A.M., and Dickerman, A.W.** (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry* **65**, 43-58.
- Begerow, D., Stoll, M., and Bauer, R.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**, 906-916.
- Bindschedler, L.V., Minibayeva, F., Gardner, S.L., Gerrish, C., Davies, D.R., and Bolwell, G.P.** (2001). Early signalling events in the apoplastic oxidative burst in suspension cultured french bean cells involve cAMP and Ca<sup>2+</sup>. *New Phytol* **151**, 185-194.
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., Ausubel, F.M., and Bolwell,**

- G.P.** (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *Plant J* **47**, 851-863.
- Blee, K.A., Jupe, S.C., Richard, G., Zimmerlin, A., Davies, D.R., and Bolwell, G.P.** (2001). Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol* **47**, 607-620.
- Bocsanczy, A.M., Nissinen, R.M., Oh, C.S., and Beer, S.V.** (2008). HrpN of *Erwinia amylovora* functions in the translocation of DspA/E into plant cells. *Mol Plant Pathol* **9**, 425-434.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bolwell, G.P.** (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 287-294.
- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., and Zimmerlin, A.** (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radic Res* **23**, 517-532.
- Bolwell, G.P., Davies, D.R., Gerrish, C., Auh, C.K., and Murphy, T.M.** (1998). Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol* **116**, 1379-1385.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., and Minibayeva, F.** (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**, 1367-1376.
- Bos, J.I., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S.C., Kamoun, S., and Birch, P.R.** (2010). *Phytophthora infestans* effector Avr3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 9909-9914.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., and Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., and Feldbrugge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Broomfield, P.L.E., and Hargreaves, J.A.** (1992). A Single Amino-Acid Change in the Iron-Sulfur Protein Subunit of Succinate-Dehydrogenase Confers Resistance to Carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **22**, 117-121.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J., and Bolwell, G.P.** (1998). Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J* **15**, 333-343.
- Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C., and Kehr, J.** (2004). Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* **219**, 610-618.
- Caplan, J., Padmanabhan, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2008). Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* **3**, 126-135.
- Chandra, S., Stennis, M., and Low, P.S.** (1997). Measurement of Ca<sup>2+</sup> fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J Biol Chem* **272**, 28274-28280.
- Chen, S.X., and Schopfer, P.** (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem* **260**, 726-735.

- Choi, H.W., Kim, Y.J., Lee, S.C., Hong, J.K., and Hwang, B.K.** (2007). Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiol* **145**, 890-904.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am Phytopathol Soc Monogr* **2**, 1-41.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria - Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *P Natl Acad Sci USA* **69**, 2110-&.
- Coll, N.S., Epple, P., and Dangl, J.L.** (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* **18**, 1247-1256.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., and VandenBosch, K.** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**, 43-55.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M., and Bolwell, G.P.** (2012). The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity. *Plant Cell*.
- de Jong, C.F., Laxalt, A.M., Bargmann, B.O., de Wit, P.J., Joosten, M.H., and Munnik, T.** (2004). Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *Plant J* **39**, 1-12.
- de Jonge, R., Bolton, M.D., and Thomma, B.P.** (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 400-406.
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., and Thomma, B.P.** (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**, 953-955.
- de Wit, P.J., Mehrabi, R., Van den Burg, H.A., and Stergiopoulos, I.** (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol Plant Pathol* **10**, 735-747.
- Deller, S., Hammond-Kosack, K.E., and Rudd, J.J.** (2011). The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves. *J Plant Physiol* **168**, 63-71.
- Ding, X., Schneider, W., Chaluvadi, S., Mian, M., and Nelson, R.** (2006). Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1229-1239.
- Ding, X.S., Rao, C.S., and Nelson, R.S.** (2007). Analysis of gene function in rice through virus-induced gene silencing. *Methods Mol Biol* **354**, 145-160.
- Dixon, M.S., Golstein, C., Thomas, C.M., van Der Biezen, E.A., and Jones, J.D.** (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: the example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *P Natl Acad Sci USA* **97**, 8807-8814.
- 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., and Kahmann, R.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H., Hardham, A.R., Jones, D.A., and Ellis, J.G.** (2009). Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol* **183**, 993-1000.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* **8**, 302-307.
- Doehlemann, G., Reissmann, S., Aßmann, D., Fleckenstein, M., and Kahmann, R.** (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Mol Microbiol* **81**, 751-766.

- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R.P., Kämper, J., and Kahmann, R.** (2008a). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**, 29-40.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., and Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., and Kämper, J.** (2008b). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-195.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H., and Kawakita, K.** (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - a review. *Gene* **179**, 45-51.
- Dong, X.N.** (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 547-552.
- Fahimi, H.D.** (1979). An assessment of the DAB methods for cytochemical detection of catalase and peroxidase. *J Histochem* **27**, 1365-1366.
- Farrell, B.D., Dussourd, D.E., and Mitter, C.** (1991). Escalation of Plant Defense - Do Latex and Resin Canals Spur Plant Diversification. *Am Nat* **138**, 881-900.
- Fellbrich, G., Blume, B., Brunner, F., Hirt, H., Kroj, T., Ligterink, W., Romanski, A., and Nurnberger, T.** (2000). *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiol* **41**, 692-701.
- Fester, T., and Hause, G.** (2005). Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* **15**, 373-379.
- Flor, H.H.** (1942). Inheritance of pathogenicity in a cross between physiologic races 22 and 24 of *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**, 653-669.
- Florence, T.M.** (1990). Free radicals, antioxidants and cancer prevention. *Proc Nutr Soc Aust Annu Conf* **15**, 88-93.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Grant, J.J., and Loake, G.J.** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**, 21-29.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* Methylation-Restriction mutants. *P Natl Acad Sci USA* **87**, 4645-4649.
- Greenbaum, D., Medzihradzky, K.F., Burlingame, A., and Bogoy, M.** (2000). Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol* **7**, 569-581.
- Greenberg, J.T.** (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 525-545.
- Gu, C., Kolodziejek, I., Misas-Villamil, J., Shindo, T., Colby, T., Verdoes, M., Richau, K.H., Schmidt, J., Overkleeft, H.S., and van der Hoorn, R.A.** (2010). Proteasome activity profiling: a simple, robust and versatile method revealing subunit-selective inhibitors and cytoplasmic, defense-induced proteasome activities. *Plant J* **62**, 160-170.
- Günther, H., Perner, B., and Gramss, G.** (1998). Activities of phenol oxidizing enzymes of ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *J Basic Microbiol* **38**, 197-206.
- Guo, Z.J., Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1998). Potentiation of the oxidative burst and isoflavonoid phytoalexin accumulation by serine protease inhibitors. *Plant Physiol* **118**, 1487-1494.

- Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., and Tanaka, I. (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* **42**, 523-528.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., and Doehlemann, G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. PLoS (in submission).
- Hilaire, E., Young, S.A., Willard, L.H., McGee, J.D., Sweat, T., Chittoor, J.M., Guikema, J.A., and Leach, J.E. (2001). Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1411-1419.
- Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., and Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* **8**, 215-221.
- Howard, J.B., and Glazer, A.N. (1969). Papaya lysozyme. Terminal sequences and enzymatic properties. *J Biol Chem* **244**, 1399-1409.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 101-127.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M., and Kämper, J. (2000). *Ustilago maydis*, The causative agent of corn smut disease. *Fung Path*, 347-371.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 41-60.
- Kämper, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., González-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vraneš, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güdener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kasai, P.H., and McLeod, D. (1977). On the Chemical Reactivity of Superoxide Ion. *J Am Chem Soc* **78**, 627-628.
- Kaschani, F., Gu, C., Niessen, S., Hoover, H., Cravatt, B.F., and van der Hoorn, R.A. (2009a). Diversity of serine hydrolase activities of unchallenged and *Botrytis*-infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1082-1093.
- Kaschani, F., Verhelst, S.H., van Swieten, P.F., Verdoes, M., Wong, C.S., Wang, Z., Kaiser, M., Overkleeft, H.S., Bogyo, M., and van der Hoorn, R.A. (2009b).

- Minitags for small molecules: detecting targets of reactive small molecules in living plant tissues using 'click chemistry'. *Plant J* **57**, 373-385.
- Kawano, T.** (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant cell reports* **21**, 829-837.
- Kim, J.F., and Beer, S.V.** (1998). HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J Bacteriol* **180**, 5203-5210.
- Kimmel, J.R., and Smith, E.L.** (1954). Crystalline papain. I. Preparation, specificity, and activation. *J Biol Chem* **207**, 515-531.
- Konno, K.** (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* **72**, 1510-1530.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., and Kohno, K.** (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J* **37**, 370-378.
- Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., Hoogendijk, E.C., and de Wit, P.J.** (1997). Assignment of amino acid residues of the Avr9 peptide of *Cladosporium fulvum* that determine elicitor activity. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 821-829.
- Kruger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S.K., Mulder, L., and Jones, J.D.G.** (2002). A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science* **296**, 744-747.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275.
- Lee, S.J., and Rose, J.K.** (2010). Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signal Behav* **5**, 769-772.
- Lehtonen, M.T., Akita, M., Kalkkinen, N., Ahola-Iivarinen, E., Ronnholm, G., Somervuo, P., Thelander, M., and Valkonen, J.P.** (2009). Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders. *New Phytol* **183**, 432-443.
- Leister, R.T., and Katagiri, F.** (2000). A resistance gene product of the nucleotide binding site - leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *Plant J* **22**, 345-354.
- Li, J.G., Liu, H.X., Cao, J., Chen, L.F., Gu, C., Allen, C., and Guo, J.H.** (2010). PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Mol Plant Pathol* **11**, 371-381.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tor, M., and Billiar, T.** (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**, 60-81.
- Lüthje, S., Meisrimler, C.N., Hopff, D., and Moller, B.** (2011). Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. *Phytochemistry* **72**, 1124-1135.
- Martinez-Espinoza, A.D., Garcia-Pedrajas, M.D., and Gold, S.E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Martinez, C., Montillet, J.L., Bresson, E., Agnel, J.P., Dai, G.H., Daniel, J.F., Geiger, J.P., and Nicole, M.** (1998). Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1038-1047.
- Mathesius, U.** (2001). Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J Exp Bot* **52**, 419-426.



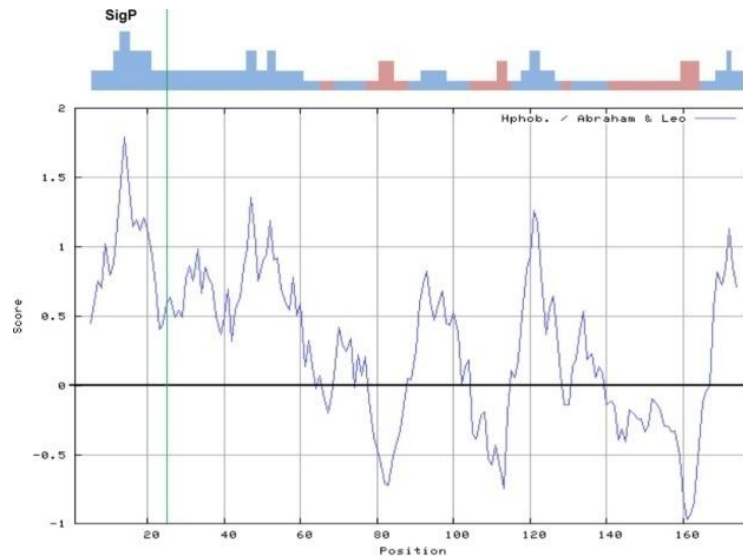
- Matsumoto, K., Yamamoto, D., Ohishi, H., Tomoo, K., Ishida, T., Inoue, M., Sadatome, T., Kitamura, K., and Mizuno, H.** (1989). Mode of binding of E-64-c, a potent thiol protease inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *FEBS letters* **245**, 177-180.
- Mehdy, M.C.** (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* **105**, 467-472.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vraneš, M., Kämper, J., and Kahmann, R.** (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P., and Talbot, N.J.** (2012). Effector-mediated suppression of Chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell*.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., and Dietz, K.J.** (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* **132**, 272-281.
- Misas-Villamil, J.C., and van der Hoorn, R.A.L.** (2008). Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 380-388.
- Müller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., and de Vries, R.P.** (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45**, 63-70.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**, 263-273.
- Munkacsi, A.B., Stoxen, S., and May, G.** (2007). Domestication of maize, sorghum, and sugarcane did not drive the divergence of their smut pathogens. *Evolution*; **61**, 388-403.
- Odonnell, K.L., and Mclaughlin, D.J.** (1984). Postmeiotic Mitosis, Basidiospore Development, and Septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **76**, 486-502.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., and Asada, K.** (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant Cell Physiol* **38**, 1118-1126.
- Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J., and Norton, R.S.** (1994). A Common Structural Motif Incorporating a Cystine Knot and a Triple-Stranded Beta-Sheet in Toxic and Inhibitory Polypeptides. *Prot Sci* **3**, 1833-1839.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., and Dunand, C.** (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* **24**, 255-265.
- Pechan, T., Cohen, A., Williams, W.P., and Luthe, D.S.** (2002). Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *P Natl Acad Sci USA* **99**, 13319-13323.
- Pechan, T., Jiang, B.H., Steckler, D., Ye, L.J., Lin, L., Luthe, D.S., and Williams, W.P.** (1999). Characterization of three distinct cDNA clones encoding cysteine proteinases from maize (*Zea mays* L.) callus. *Plant Mol Biol* **40**, 111-119.
- Proels, R.K., Oberhollenzer, K., Pathuri, I.P., Hensel, G., Kumlehn, J., and Huckelhoven, R.** (2010). RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1143-1150.
- Ramberg, J.E., and Mclaughlin, D.J.** (1980). Ultrastructural-Study of Promycelial Development and Basidiospore Initiation in *Ustilago maydis*. *Can J Bot/Rev Can Bot* **58**, 1548-1561.
- Rappay, G.** (1989). Proteinases and Their Inhibitors in Cells and Tissues - Introduction. *Prog Histochem Cytochem* **18**, 1-60.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., and Barrett, A.J.** (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **36**, D320-325.

- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S., and Woo, H.A. (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current opinion in cell biology* **17**, 183-189.
- Rivas-San Vicente, M., and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J Exp Bot* **62**, 3321-3338.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., and Kämper, J. (2000). Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- Rooney, H.C., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D., and de Wit, P.J. (2005). *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**, 1783-1786.
- Rowe, H.C., and Kliebenstein, D.J. (2010). All Mold is not alike: The importance of intraspecific diversity in necrotrophic plant pathogens. *PLoS Pathog* **6**.
- Salzwedel, J.L., and Dazzo, F.B. (1993). pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from white clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Molecular plant-microbe interactions Mol Plant Microbe Interact* **6**, 127-134.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Schipper, K. (2009). Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters, das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., and Kahmann, R. (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schlesinger, R., Kahmann, R., and Kämper, J. (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Schulze-Lefert, P. (2004). Knocking on heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 377-383.
- Segal, A.W., and Abo, A. (1993). The Biochemical Basis of the NADPH Oxidase of Phagocytes. *Trends Biochem Sci* **18**, 43-47.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *P Natl Acad Sci USA* **98**, 4788-4793.
- Sessa, R.A., Bennett, M.H., Lewis, M.J., Mansfield, J.W., and Beale, M.H. (2000). Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species. Major latex components are novel oxalate and sulfate conjugates of lactucin and its derivatives. *J Biol Chem* **275**, 26877-26884.
- Sethi, A., McAuslane, H.J., Rathinasabapathi, B., Nuessly, G.S., and Nagata, R.T. (2009). Enzyme Induction as a Possible Mechanism for Latex-Mediated Insect Resistance in Romaine Lettuce. *J Chem Ecol* **35**, 190-200.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W. (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.
- Shindo, T., and van der Hoorn, R.A.L. (2008). Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol Plant Pathol* **9**, 119-125.
- Skibbe, D.S., Doehlemann, G., Fernandes, J., and Walbot, V. (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**, 89-92.

- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., and Mims, C.W.** (1993). Infection of Maize Stigmas by *Ustilago maydis* - Light and Electron-Microscopy. *Phytopathol* **83**, 843-850.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., and Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.
- Snyder, B.A., and Nicholson, R.L.** (1990). Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress. *Science* **248**, 1637-1639.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., and Levine, A.** (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**, 431-444.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-&.
- Spanu, P., and Bonfantefasolo, P.** (1988). Cell-Wall-Bound Peroxidase-Activity in Roots of Mycorrhizal *Allium-Porrum*. *New Phytol* **109**, 119-124.
- Stahl, E.A., and Bishop, J.G.** (2000). Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 299-304.
- Strickler, J.E., Berka, T.R., Gorniak, J., Fornwald, J., Keys, R., Rowland, J.J., Rosenberg, M., and Taylor, D.P.** (1992). Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. Purification, activity, cloning, and expression. *J Biol Chem* **267**, 3236-3241.
- Sutherland, M.W.** (1991). The generation of oxygen radicals during host plant-responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* **39**, 79-93.
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., and Kumar, A.** (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant signaling & behavior* **5**, 1370-1378.
- Tarvainen, O., Markkola, A.M., Ahonen-Jonnarh, U., Jumpponen, A., and Strommer, R.** (2004). Changes in ectomycorrhizal colonization and root peroxidase activity in *Pinus sylvestris* nursery seedlings planted in forest humus. *Scand J of Forest Res* **19**, 400-408.
- Thomma, B.P., van Esse, H.P., Crous, P.W., and de Wit, P.J.** (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Mol Plant Pathol* **6**, 379-393.
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S.** (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* **279**, 26370-26377.
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S.** (2007). A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant physiology* **143**, 364-377.
- Tian, M.Y., Benedetti, B., and Kamoun, S.** (2005). A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant physiology* **138**, 1785-1793.
- Torres, M.A.** (2010). ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* **138**, 414-429.
- Torres, M.A., Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**, 373-378.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Valverde, M.E., Paredes-Lopez, O., Pataky, J.K., and Guevara-Lara, F.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source - biology, composition, and production. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**, 191-229.
- van't Klooster, J.W., van der Kamp, M.W., Vervoort, J., Beekwilder, J., Boeren, S., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.P.H.J., and de Wit, P.J.G.M.** (2011). Affinity of

- Avr2 for tomato cysteine protease Rcr3 correlates with the Avr2-triggered Cf-2-mediated hypersensitive response. *Mol Plant Pathol* **12**, 21-30.
- van den Burg, H.A., Spronk, C.A., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P., Vuister, G.W., de Wit, P.J., and Vervoort, J.** (2004). Binding of the Avr4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of Avr4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *J Biol Chem* **279**, 16786-16796.
- van der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-456.
- van der Hoorn, R.A., and Jones, J.D.** (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 400-407.
- van der Hoorn, R.A., and Kaiser, M.** (2011). Probes for activity-based profiling of plant proteases. *Physiol Plant*
- van der Hoorn, R.A.L.** (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 191-223.
- van der Hoorn, R.A.L., Leeuwenburgh, M.A., Bogyo, M., Joosten, M.H.A.J., and Peck, S.C.** (2004). Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiol* **135**, 1170-1178.
- van der Linde, K., Kastner, C., Kumlehn, J., Kahmann, R., and Doehlemann, G.** (2011). Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. *New Phytol* **189**, 471-483.
- Verdoes, M., Florea, B.I., Menendez-Benito, V., Maynard, C.J., Witte, M.D., Van der Linden, W.A., Van den Nieuwendijk, A.M.C.H., Hofmann, T., Berkers, C.R., van Leeuwen, F.W.B., Groothuis, T.A., Leeuwenburgh, M.A., Ovaas, H., Neefjes, J.J., Filippov, D.V., Van der Marel, G.A., Dantuma, N.P., and Overkleeft, H.S.** (2006). A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes *in vitro* and *in vivo*. *Chem Biol* **13**, 1217-1226.
- Wang, B., Yang, X., Zeng, H., Liu, H., Zhou, T., Tan, B., Yuan, J., Guo, L., and Qiu, D.** (2011). The purification and characterization of a novel hypersensitive-like response-inducing elicitor from *Verticillium dahliae* that induces resistance responses in tobacco. *Appl Microbiol Biotechnol*
- Weber, I., Gruber, C., and Steinberg, G.** (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**, 2826-2842.
- Wojtaszek, P., Trethowan, J., and Bolwell, G.P.** (1997). Reconstitution *in vitro* of the components and conditions required for the oxidative cross-linking of extracellular proteins in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *FEBS letters* **405**, 95-98.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G., and Obinger, C.** (2010). Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Arch Biochem Biophys* **500**, 45-57.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., Mengiste, T., Zhang, Y., and Zhou, J.** (2010). Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell host & microbe* **7**, 290-301.
- Zhirnov, O.P., Klenk, N.D., and Wright, P.F.** (2011). Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res* **92**, 27-36.
- Zimmerman, M., Yurewicz, E., and Patel, G.** (1976). A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* **70**, 258-262.

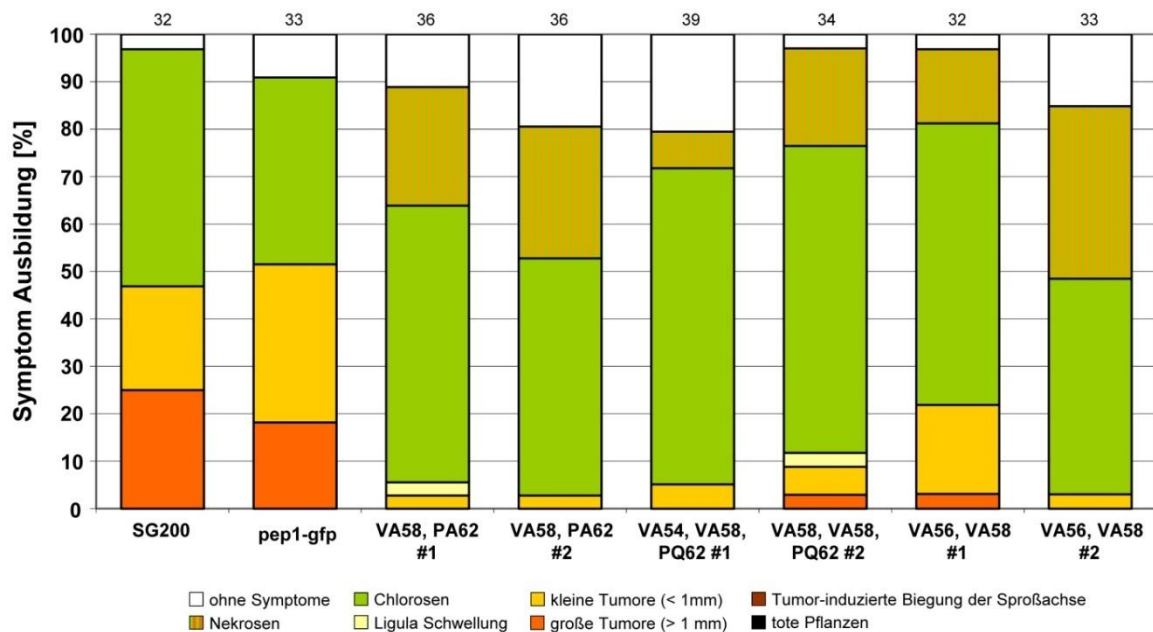
## 6 Anhang



**Abbildung 31: Hydropathie-Plot von Pep1.** Positive Werte/blau Balken stehen für Hydrophobizität, negative Werte/rote Balken für Hydrophilizität. Hydropathy-Plot nach der Methode von (Abraham and Leo, 1987) (erstellt mit Protscale, <http://web.expasy.org/protscale/>).



**Abbildung 32: Konservierte Domänen der Klasse-III-Häm-Peroxidasen** (Lehtonen *et al.*, 2009). Aminosäuresequenzvergleich von POX12 mit ausgehählten Klasse-III-Häm-Peroxidasen. Grüne Boxen: Signalpeptid Regionen (Ausgehend von der Signalpeptid-Vorhersage mittels SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)). Rote Boxen: Konservierte Reste welche für die katalytische Aktivität wichtig sind. Graue Boxen: Substrat-Eingangs-Kanal auskleidende Reste. Grün schattierte Boxen: Ca<sup>2+</sup>-binde-Reste. Schwarze Boxen: Disulfidbrücken bildende Cystein-Reste. Die vorhergesagte Asp-Arg-Salzbrücken-Reste wird durch " \* " angezeigt. Die für den Vergleich mit POX12 zu Grunde gelegten POX sind: POX12, (*Zea mays*) (ACG36543); RP-C1A, (*Armorica rusticana*) (P00433.2); PO-C1, (*Oryza sativa*) (AAF65464.2); PpaPrx34b (*Physcomitrella patens*) (XP\_001777299.1); BP1 (*Hordeum vulgare*) (Q40069); WP1 (*Triticum aestivum*) (AF525425). (Sequenzvergleich mittels „Sequence Assembly“/FastScan Method, Clonemanager 9.0).



**Abbildung 32: Mehrfachsubstitutionen im ersten putativen Serinprotease-Inhibitormotiv von Pep1 führen zur Abnahme der Pathogenität.** Virulenzanalyse der Stämme *U. maydis* SG200, SG200 $\Delta$ pep1-pep1:GFP (pep1-gfp), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA58,PA62</sup>:GFP (VA58, PA62), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA54,VA58,PQ62</sup>:GFP (VA54, VA58, PQ62), SG200 $\Delta$ pep1-pep1<sup>VA56,VA58</sup>:GFP (VA56, VA58). Alle Komplementations-Stämme tragen eine einfache Integration des Komplementationskonstruktes im *ip*-Lokus. Die Abkürzungen der verschiedenen Stammbezeichnungen stehen in Klammern. Getestet wurden jeweils zwei Klone (#1 bzw. #2) des gleichen Stammes. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist über den Graphen angegeben. Die Quantifizierung der Krankheitssymptome erfolgte 12 Tage nach Infektion. Die Legende für die Klassifizierung der verschiedenen Symptome ist unten gezeigt. Alle eingebrachten Substitutionen führten zu einer Abnahme der Pathogenität.

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Dr. Gunther Döhlemann für die vielfältige Unterstützung bei der Bearbeitung dieses hochinteressanten Forschungsthemas sowie seine jederzeit offene Tür und seine Diskussionsbereitschaft im Rahmen der Betreuung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen Konferenzen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahmann, Herrn Prof. Dr. Uwe Maier und Dr. Martin Thanbichler bedanken, welche als IMPRS „*Thesis Advisory Committee*“ meine Arbeit durch wertvolle Tipps und Anregungen entscheidend beeinflussten. Auch bedanke ich mich bei ihnen für die freundliche Übernahme der Gutachten und ihre Mühen.

Außerdem danke ich der gesamten AG Döhlemann sowie den derzeitigen und mir bekannten ehemaligen Mitgliedern der AG Kahmann für die Unterstützung sowie zahlreiche hilfreiche Diskussionen die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank geht an meinen Kollegen Christoph Hemetsberger für die Bereitschaft gemeinschaftlich das Geheimnis um die beschriebenen 178 Aminosäuren zu knacken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Renier van der Hoorn für die Möglichkeit Teile dieser Arbeit am MPIZ in Köln durchführen zu können. Auch geht ein besonderer Dank an Takayuki Shindo am MPIZ Köln, für die erstklassige Einführung ins *Activity based protein profiling*.

Vor allem aber danke ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern die trotz der großen Entfernung eine immense Unterstützung waren! Auch bedanke ich mich bei allen meinen Geschwistern, Nichten und Neffen sowie dem Rest der Familie – die Telefonate, kleinen Kurzurlaube oder Besuche und das Korrekturlesen waren goldwert. Auch möchte ich mich bei meinen Freunden Matthias und Heiko bedanken, für die Entfernung kein Problem war.








Ganz besonders danke ich meiner Verlobten Iryna Bulyha – Спаси́бо за все!

## **Lebenslauf**

Die Seite 115 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.



## Daten-CD

- [-]  Daten-CD
  -  AF\_Inhibition\_Pep1
  - [-]  Bonituren
    - [+]  Cys\_Mutation
    - [+]  N\_C\_Trunkierungen
    - [+]  Pep1\_Motiv1\_2\_Mutationen
    - [+]  Ser\_GlyRich\_Region\_Kompl