

Das Effektorprotein Pep1 und seine Rolle in der Biotrophie von Brandpilzen



Dissertation

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

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christoph Florian Hemetsberger

aus Marburg an der Lahn

Marburg / Lahn, 2012

Das Effektorprotein Pep1 und seine Rolle in der Biotrophie von Brandpilzen

Dissertation

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

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christoph Florian Hemetsberger

aus Marburg an der Lahn

Marburg / Lahn, 2012

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis September 2012 unter Betreuung von PD 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: 28.12.2012

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2013

Teile dieser Arbeit wurden im folgenden Artikel veröffentlicht:

Hemetsberger C*, Herrberger C*, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens* 2012 May; 8(5): e1002684.

Weitere Veröffentlichungen:

van der Linde K, Hemetsberger C, Kastner C, Kashani F, van der Hoorn RAL, Kumlehn J, Doehlemann G. (2012) A maize cystatin suppresses host immunity by inhibition of apoplastic cysteine proteases. *Plant Cell*. 2012 Mar;24(3):1285-300.

van der Linde K, Mueller A, Hemetsberger C, van der Hoorn R, Kashani F, Doehlemann G. (2012) The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant Signaling and Behaviour*. 2012 Sep 7;7(11).

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Das Effektorprotein Pep1 und seine Rolle in der Biotrophie von Brandpilzen“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt 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.

(Ort / Datum)

Christoph Hemetsberger

... die Wissenschaft bildet ein einheitliches Ganzes, und die einzelnen Forscher sind, so verschiedenartige Wege sie auch gehen mögen, doch schließlich alle nur Diener an einem und demselben Werk. Diese Einheitlichkeit immer wieder in lebendigem Bewußtsein zu erhalten, ist eine mit der Entwicklung der Wissenschaft stetig bedeutungsvoller werdende Aufgabe ...

Max Planck

21 is only half the truth.

nach Douglas Adams

Zusammenfassung

Der Brandpilz *Ustilago maydis* benötigt während der Interaktion mit seiner Wirtspflanze Mais eine Vielzahl sekretierter Effektoren zur Etablierung der Biotropie. Eine Deletion des Gens *um01987*, das für den sekretierten Effektor Pep1 (*protein essential during penetration 1*) codiert, führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Auf Penetrationsversuche der *pep1*-Deletionsmutante reagiert die Maispflanze mit der Induktion verschiedener Abwehrmechanismen wie der Bildung von Papillen, der Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies und nekrotischen Läsionen. Pep1 lokalisiert in der biotrophen Interaktionszone und ist in verschiedenen Brandpilzarten konserviert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Pep1 durch biochemische und molekularbiologische Methoden charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass heterolog in *Escherichia coli* exprimiertes Pep1 den *oxidative burst* in Mais inhibieren kann. Eine Behandlung von Maispflanzen mit dem Radikalfänger Ascorbat hatte verminderte Abwehrreaktionen gegenüber Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante zur Folge. Weiterhin wurde gezeigt, dass Pep1 die Aktivität einer Klasse-III-Peroxidase aus Meerrettich *in vitro* hemmt. Klasse-III-Peroxidasen spielen eine zentrale Rolle in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beim *oxidative burst*. Bei Infektionen von Mais mit der *pep1*-Deletionsmutante ist die sekretierte Peroxidase-12 (POX12) transkriptionell induziert. Durch Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Hefe-2-Hybrid-Experimente konnte eine direkte Interaktion von Pep1 mit POX12 nachgewiesen werden. Durch virusinduziertes Gen-Silencing von *pox12* in Mais konnte eine partielle Rettung des $\Delta pep1$ -Phänotyps erreicht werden. Das Silencing von *pox12* bewirkte verminderte Abwehrreaktionen der Wirtspflanze wie z. B. Papillenbildungen an Penetrationsstellen, so dass die Hyphen der *pep1*-Deletionsmutante in der Folge die Epidermiszellen penetrieren konnten.

Darüber hinaus konnten Orthologe von *pep1* in weiteren Brandpilzspezies identifiziert werden. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass die Pep1-Orthologe aus *Ustilago avenae*, *Ustilago nuda* und *Melanopsichium pennsylvanicum* ebenfalls als Peroxidaseinhibitoren agieren. Weiterhin wurde die Inhibition apoplastischer Peroxidasen aus verschiedenen Wirtspflanzen durch Pep1 nachgewiesen. Schließlich wurde die Funktion der identifizierten Pep1-Orthologe in Infektionen von Mais mit *U. maydis* bestätigt.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Rolle von Pep1 als Inhibitor von Peroxidasen, einer zentralen Komponente der basalen pflanzlichen Abwehrreaktion.

Summary

For establishment of the biotrophic interaction with its host plant maize, the corn smut fungus *Ustilago maydis* depends on a variety of secreted effector proteins. A deletion of *um01987*, the gene encoding for the secreted effector Pep1 (*protein essential during penetration 1*), leads to a complete loss of pathogenicity. Penetration attempts of the deletion mutant elicit strong plant defense responses such as the accumulation of reactive oxygen species (ROS), papilla formation and necrotic lesions. Pep1 localizes in the biotrophic interface and is conserved within different smut fungi. This study focuses on the functional characterization of Pep1 with biochemical and molecular biological methods. It was demonstrated that heterologously expressed Pep1 protein from *Escherichia coli* inhibits the oxidative burst in maize. Treatment of maize plants with the ROS scavenger ascorbate led to reduced defense responses in reaction to *pep1* infections. In addition, Pep1 was shown to inhibit activity of a class III peroxidase from horseradish *in vitro*. Class III peroxidases play a pivotal role in ROS production during the oxidative burst. In maize plants, inoculated with the *pep1* deletion mutant, the secreted peroxidase 12 (POX12) is transcriptionally induced. Bimolecular fluorescence complementation and yeast-2-hybrid experiments revealed a direct interaction of Pep1 with POX12. Virus induced gene silencing of *pox12* in maize partially restored the $\Delta pep1$ phenotype. Silencing of *pox12* led to reduced plant defense responses, such as papilla formation at penetration sites. As a consequence, hyphae of the *pep1* mutant penetrated epidermal cells of *pox12* silencing plants.

Furthermore, orthologs of *pep1* in additional smut species were identified. *In vitro* studies showed peroxidase inhibition by Pep1 orthologs from *Ustilago avenae*, *Ustilago nuda* and *Melanopsichium pennsylvanicum*. Additionally, inhibition of apoplastic peroxidases from different host plants by Pep1 was demonstrated. Maize infection studies with *U. maydis* confirmed the biological function of the identified *pep1* orthologs.

In summary, these results suggest a role of Pep1 as inhibitor of peroxidases, a core component of the basal plant defense response.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat
Amp	Ampicilin	nm	Nanometer
Anm.	Anmerkung	N-terminal	aminoterminal
AS	Aminosäure	OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei 600 nm
Avr	Avirulenz	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion <i>polymerase chain reaction</i>
bp	Basenpaare	PD	<i>potato dextrose</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	PEG	Polyethylenglycol
bzw.	beziehungsweise	Pep1	<i>protein essential during penetration 1</i>
Cam	Chloramphenicol	Pep1 _{IA}	Pep1 inaktiviert
Cbx	Carboxin	Phleo	Phleomycin
cDNA	<i>complementary DNA</i>	Pit	<i>proteins important for tumor formation</i>
CC9	Mais Cystatin 9 (<i>corn Cystatin 9</i>)	POX	Peroxidase
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>	PR	<i>pathogenesis related</i>
C-terminal	carboxyterminal	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
Δ	Deletion	PTI	PAMP <i>triggered immunity</i>
Da	Dalton	qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
DAB	Diaminobenzidin	qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>	R	<i>resistance</i>
dpi	<i>days post infection</i>	RFP	<i>red fluorescent protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	RFU	<i>relative fluorescence units</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
DPI	<i>diphenylene iodonium chloride</i>	RNAi	RNA-Interferenz
dpi	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)	ROS	reactive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
eBIFC	<i>enhanced bimolecular fluorescence complemetation</i>	RU	<i>relative units</i> (Aktivität)
ETI	<i>effector triggered immunity</i>	rv	<i>reverse</i>
ETS	<i>effector triggered susceptibility</i>	s	Sekunde(n)
f.c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)	SA	Salizylsäure (<i>salicylic acid</i>)
fw	<i>forward</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
gDNA	genomische DNA	SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	SHAM	<i>salicyl hydroxamic acid</i>
h	Stunde/Stunden	siRNA	<i>short interfering RNAs</i>
H ₂ O _{bid}	zweifach destilliertes Wasser	Tab.	Tabelle
HA	Hemagglutinin	TEM	Transmissions-elektronenmikroskop
hpi	<i>hours post infection</i>	Tet	Tetracyclin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Hyg	Hygromycin	u	<i>unit</i> (enzymat. Aktivität)
ip	<i>iron-sulphur protein</i>	UV	Ultraviolett
JA	Jasmonsäure (<i>jasmonic acid</i>)	U/min	Umdrehungen pro Minute
Kan	Kanamycin	vgl.	vergleiche
Kap.	Kapitel	VIGS	virusinduziertes Gen- <i>silencing</i>
kb	Kilobasen	wt	Wildtyp
kDa	Kilodalton	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
M	molar (mol/l)	z. B.	zum Beispiel
m	Meter		
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>		
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase		
mM	milimolar (mmol/l)		
min	Minute(n)		
mRNA	<i>messenger RNA</i>		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das pflanzliche Immunsystem.....	1
1.1.1. Die Rolle des <i>oxidative burst</i> in der pflanzlichen Abwehrreaktion	4
1.1.2. Die Bedeutung von Peroxidasen für den <i>oxidative burst</i>	5
1.2. Sekretierte Effektoren interferieren mit dem pflanzlichen Immunsystem	9
1.2.1. Spezifität und Konservierung von Effektorproteinen	11
1.3. Brandpilze und <i>Ustilago maydis</i> als Modellsystem	12
1.3.1. Der Maisbeulenbrand <i>U. maydis</i>	12
1.3.2. Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	14
1.3.3. Sekretierte Effektoren von <i>U. maydis</i>	17
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2. Ergebnisse	20
2.1. Funktionelle Charakterisierung des sekretierten Effektors Pep1 aus <i>Ustilago maydis</i>	20
2.1.1. Bestätigung der Lokalisierung von Pep1	20
2.1.2. Mikroskopische Charakterisierung der pflanzlichen Abwehrreaktion	21
2.1.3. Pep1 inhibiert den PAMP-ausgelösten „oxidative burst“	27
2.1.4. Pep1 inhibiert eine pflanzliche Peroxidase	29
2.1.5. Pep1 interagiert mit POX12 <i>in vivo</i>	31
2.1.6. <i>Silencing</i> von POX12 in Mais führt zur partiellen Wiederherstellung der Virulenz der <i>pep1</i> -Deletionsmutante	35
2.2. Pep1 ist in verschiedenen Brandpilzarten funktionell konserviert	37

2.2.1.	Pep1 aus <i>U. maydis</i> hat eine Funktion im Pathosystem <i>U. hordei</i> / <i>Hordeum vulgare</i>	37
2.2.2.	Pep1-Orthologe liegen in <i>Ustilago</i> -Arten und den Gattungen <i>Melanopsichium</i> und <i>Exobasidium</i> vor	39
2.2.3.	Verschiedene Pep1-Orthologe agieren als Peroxidaseinhibitoren	40
2.2.4.	Pep1 aus <i>U. maydis</i> inhibiert Peroxidaseaktivität in den Wirtspflanzen anderer Brandpilze	41
2.2.5.	Pep1 aus verschiedenen Brandpilzspezies kann die Virulenz der <i>pep1</i> -Deletionsmutante in Mais wiederherstellen	42
3.	Diskussion	45
3.1.	Pep1 ist ein apoplastischer Effektor	45
3.1.1.	Pep1 lokalisiert im Apoplasten	45
3.1.2.	Pep1 unterdrückt die pflanzliche Abwehrreaktion	46
3.1.3.	Pep1 inhibiert den apoplastischen <i>oxidative burst</i>	48
3.2.	Pep1 ist ein Peroxidaseinhibitor	49
3.2.1.	Pep1 inhibiert pflanzliche Peroxidaseaktivität	49
3.2.2.	Pep1 bindet an die Peroxidase POX12 aus Mais	50
3.2.3.	Die Peroxidase-Inhibition durch Pep1 ist essentiell für die Etablierung der biotrophen Interaktion	51
3.2.4.	Modell zur Funktion von Pep1 in der biotrophen Interaktion	52
3.3.	Pep1 ist innerhalb der Brandpilze konserviert	55
3.3.1.	Pep1-Orthologe sind in verschiedenen Arten konserviert	55
3.4.	Ausblick	58
4.	Material und Methoden.....	60
4.1.	Material und Bezugsquellen	60
4.1.1.	Chemikalien	60
4.1.2.	Puffer und Lösungen	60
4.1.3.	Enzyme und Antikörper	60
4.1.4.	Verwendete Kits	61
4.2.	Zellkultivierung	61

4.2.1.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	61
4.2.2.	Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i>	62
4.2.3.	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	62
4.2.4.	Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen	63
4.3.	Verwendete Stämme, Oligonukleotide und Plasmide.....	63
4.3.1.	<i>E. coli</i> – Stämme	63
4.3.2.	<i>A. tumefaciens</i> – Stämme	64
4.3.3.	<i>U. maydis</i> - Stämme.....	64
4.3.4.	<i>U. hordei</i> - Stämme	66
4.3.5.	<i>S. cerevisiae</i> - Stämme	66
4.3.6.	Oligonukleotide	66
4.3.7.	Plasmide	70
4.4.	Mikrobiologische Standardmethoden	76
4.4.1.	Rubidiumchlorid-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	76
4.4.2.	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> durch Elektroporation	77
4.4.3.	Transformation von <i>U. maydis</i>	77
4.4.4.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	79
4.4.5.	Blau-Weiß-Selektion von <i>E. coli</i> -Transformanden	79
4.5.	Molekularbiologische Methoden.....	79
4.5.1.	<i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	79
4.5.2.	Isolierung von Nukleinsäuren	83
4.5.3.	Southern Blot	84
4.6.	Biochemische Methoden.....	86
4.6.1.	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	86
4.6.2.	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC).....	87
4.6.3.	Auftrennung von Proteinen.....	88
4.6.4.	Coomassie-Proteinfärbung.....	89
4.6.5.	Proteinbestimmung nach Bradford	90
4.6.6.	Luminolbasierte Quantifikation der Peroxidproduktion in Mais.....	90

4.6.7.	Nachweis von Wasserstoffperoxid durch Xylenolorange-Färbung.....	90
4.6.8.	Messung der Peroxidaseaktivität.....	91
4.6.9.	Analyse von Proteininteraktionen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System	92
4.7.	Mikroskopie.....	92
4.7.1.	Konfokale Mikroskopie	92
4.7.2.	Transmissionselektronenmikroskopie.....	94
4.8.	Pflanzenmethoden.....	94
4.8.1.	Virusinduziertes Gen- <i>Silencing</i>	94
4.8.2.	<i>Zea mays</i>	96
4.8.3.	Tabak.....	98
4.8.4.	Präparation von apoplastischer Flüssigkeit aus Pflanzenblättern	99
4.9.	Bioinformatische Analysen.....	99
5.	Literaturverzeichnis.....	100
6.	Anhang.....	114

1. Einleitung

1.1 Das pflanzliche Immunsystem

Das pflanzliche Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene zu erkennen und deren Eindringen zu verhindern. Die Abwehrstrategie kann dabei in zwei grundlegend verschiedene Klassen eingeteilt werden: die präformierte und die induzierte Abwehr. Unter präformierter Abwehr versteht man physische Barrieren wie die mechanisch stabile Zellwand oder die Cuticula, die nicht nur das Eindringen von mikrobiellen Pathogenen erschweren, sondern auch einen Schutz gegen Austrocknung und abiotischen Stress darstellen, sowie chemische Barrieren wie sekretierte Metabolite. Die induzierte Abwehr hingegen basiert auf der Erkennung bestimmter nichtpflanzlicher Muster, sogenannter *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) bzw. *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), wie z. B. das bakterielle Flagellin oder das pilzliche Chitin. Die Erkennung dieser Muster erfolgt durch spezifische Rezeptoren, die *pattern recognition receptors* (PRRs) (Boller, 1995; Felix *et al.*, 1993; Gomez-Gomez und Boller, 2000; Iriti und Faoro, 2009; Zhang und Zhou, 2010; Zipfel *et al.*, 2006). PRRs sind hochkonserviert und bestehen aus einer extrazellulären *leucine rich repeat* - Domäne und einer intrazellulären Kinasedomäne. Die Detektion von PAMPs durch PRRs führt zur Aktivierung abwehrspezifischer Signalwege in der Pflanzenzelle, die primäre Abwehrreaktionen wie z. B. die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (vgl. Kap. 1.1.1), die Verstärkung der Zellwände durch Calloseauflagerungen (Papillen) und Lignifizierungen (Bhuiyan *et al.*, 2009; Ros Barceló, 1997), die Akkumulation des Phytohormons Salizylsäure (*salicylic acid*, SA) (Bennett und Wallsgrove, 1994; Enyedi *et al.*, 1992; Vlot *et al.*, 2009) und die Aktivierung von *pathogenesis related* (PR)-Proteinen wie Chitinasen oder Proteasen (Sels *et al.*, 2008; Shewry und Lucas, 1997; van Loon *et al.*, 2006) auslösen und ein Vordringen des Pathogens verhindern sollen. Man spricht hierbei von PAMP-vermittelter Immunität (*PAMP triggered immunity*, PTI) (Jones und Dangl, 2006). Neben der Immunreaktion auf PAMPs als exogene Elicitoren können auch endogene Elicitoren eine Abwehrreaktion in der Pflanze auslösen. Diese pflanzeigenen Moleküle, die sogenannten *damage associated molecular patterns* (DAMPs) werden durch Verletzung des pflanzlichen

Gewebes, zum Beispiel durch Fressfeinde oder eben das Eindringen eines mikrobiellen Pathogens aus der Pflanzenzelle freigesetzt und durch PRRs detektiert (Boller und Felix, 2009; Lotze *et al.*, 2007; Rubartelli und Lotze, 2007). Bei solchen Formen der Abwehrreaktion handelt es sich um eine Immunantwort, die nicht spezifisch für das eindringende Pathogen ist, sondern nur auf der Erkennung molekularer Muster beruht, die mit einem Pathogenbefall assoziiert werden. Um dieser frühen Immunantwort zu entgehen, sekretieren adaptierte Pathogene sogenannte Effektorproteine, die mit der Immunantwort interferieren und so eine Besiedelung der Wirtspflanze ermöglichen (De Wit *et al.*, 2009; Stergiopoulos und de Wit, 2009) (siehe auch Kap. 1.2). Man spricht hierbei von Effektor-vermittelter Suszeptibilität (*effector triggered susceptibility*, ETS). Generell lässt sich festhalten, dass jedes erfolgreiche biotrophe Pathogen die PAMP-induzierte Abwehrreaktion inhibieren muss, um eine Besiedelung des Wirtes zu erreichen (Nomura *et al.*, 2005). Pflanzen wiederum unterliegen einem Selektionsdruck, der die Hervorbringung von Abwehrstrategien begünstigt, die einen Befall durch Pathogene verhindern. Demnach haben sich in den Pflanzen Resistenzmechanismen ausgebildet, die die erste Welle von sekretierten Effektoren der Pathogene erkennen und so Effektor-induzierte Immunität (*effector triggered immunity*, ETI) auslösen. In einem evolutionären „Wettrüsten“ (*arms race*) kam es so zu einer diversifizierenden Koevolution zwischen Wirt und Pathogen, wobei sich jeweils neue Abwehr- und Infektionsstrategien entwickelten, um einen Selektionsvorteil zu erlangen (Birch *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2009) (Abb. 1). Dieses Phänomen wurde von Jones und Dangl im sog. *zig-zag-zig*-Modell dargestellt, in dem die Intensität der pflanzlichen Abwehrreaktion der Sekretion von Effektorproteinen gegenübergestellt wird (Jones und Dangl, 2006).

Anhand ihrer Ernährungsweise werden Pflanzenpathogene in drei Gruppen eingeordnet: Biotrophe, Hemibiotrophe und Nekrotrophe. Während Nekrotrophe das befallene Pflanzengewebe abtöten und in der Folge als Nährstoffquelle nutzen, besiedeln hemibiotrophe Pathogene zunächst das lebende Wirtsgewebe und töten dieses erst nach einiger Zeit (van Kan, 2006). Biotrophe Pathogene hingegen befallen ausschließlich lebendes Gewebe und ernähren sich von den Stoffwechselprodukten des Wirtes (Glazebrook, 2005). Sie sind somit von der Konstitution der Wirtspflanze abhängig. Diese Lebensweise macht es erforderlich, dass Biotrophe aktiv in den Stoffwechsel und das Immunsystem des Wirtes eingreifen, um die Nährstoffverteilung umzuleiten und die pflanzliche Abwehr, insbesondere programmierten Zelltod, zu unterdrücken. Hierbei spielen ebenfalls sekretierte Effektorproteine eine zentrale Rolle.

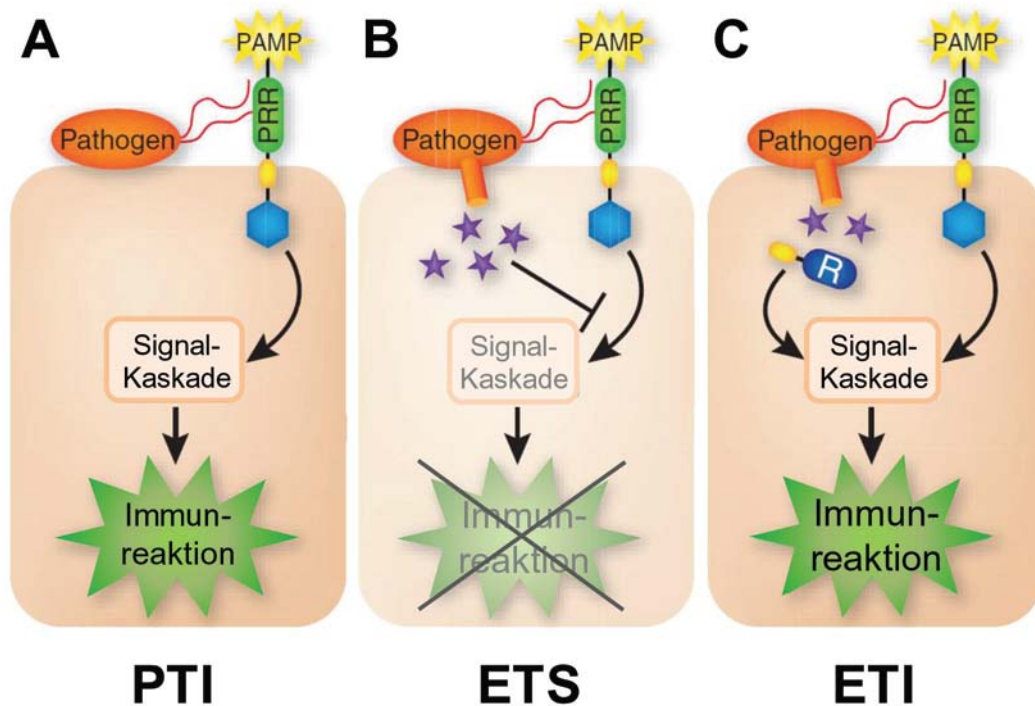


Abbildung 1: Modell der Funktion des pflanzlichen Immunsystems

A: Beim Eindringen eines Pathogens erkennt die Pflanze PAMPs durch PRRs. Dies löst eine Signalkaskade aus, die eine PAMP-induzierte Immunantwort (PTI) zur Folge hat. **B:** Ein angepasstes Pathogen sekretiert Effektorproteine, die mit der PTI interferieren, die Immunreaktion unterdrücken und so Suszeptibilität herstellen (ETS). **C:** Resistente Pflanzen haben R-Proteine ausgebildet, die spezifisch Effektoren erkennen und eine Immunantwort auslösen (ETI). Abbildung modifiziert nach Pieterse *et al.* (2009).

Im Rahmen der ETI sind resistente Pflanzen in der Lage, Effektorproteine durch spezifische *resistance* (R)-Proteine zu erkennen und so eine Immunreaktion auszulösen. R-Proteine verfügen über eine Nukleotid-Bindestelle und eine *leucine rich repeat* – Domäne (Meyers *et al.*, 2003; Takken *et al.*, 2006). Die Resistenzvermittlung durch R-Proteine, also die Erkennung eines sog. Avirulenzproteins (Avr) durch einen spezifischen Rezeptor, wird als *gene-for-gene*-Interaktion bezeichnet (Flor, 1971; Keen, 1990). In beiden Formen der induzierten Resistenzvermittlung, PAMP-induzierte- und Effektor-induzierte Immunität (*effector triggered immunity*, ETI), spielen die Phytohormone SA und Jasmonsäure (*jasmonic acid*, JA) jeweils eine wichtige Rolle (Dong, 1998). Diese beiden Phytohormone induzieren verschiedene Abwehrmechanismen, die auf unterschiedlichen PR-Genen basieren und verhalten sich dabei antagonistisch zueinander (Kunkel und Brooks, 2002; Takahashi *et al.*, 2004). Vereinfacht kann man sagen, dass SA bei einem Befall durch biotrophe Pathogene ausgeschüttet wird und JA als Reaktion auf nekrotrophe Pathogene sowie Fressfeinde (Glazebrook, 2005). Eine JA-vermittelte Abwehrreaktion führt zur vermehrten Sekretion von Sekundärmetaboliten wie z. B.

Flavenoiden und Terpenen, die toxisch auf eindringende Pathogene wirken (Gundlach *et al.*, 1992; Memelink *et al.*, 2001). Die Akkumulation von SA beim Eindringen eines Pathogens führt hingegen zur Induktion eines Abwehrmechanismus, der auf der Anreicherung von ROS in der Zelle basiert (Shirasu *et al.*, 1997) und schließlich zur Induktion einer hypersensitiven Antwort (*hypersensitive response*, HR) führen kann (Morel und Dangl, 1997). Hierbei handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltods (*programmed cell death*, PCD), die darauf ausgerichtet ist, die befallenen Pflanzenzellen mitsamt des eindringenden Pathogens abzutöten. Die rasche Anreicherung von ROS im Rahmen einer Pathogenabwehr wird *oxidative burst* genannt (Bolwell *et al.*, 2002; Lamb und Dixon, 1997). Die gebildeten ROS können direkt mit DNA und Proteinen reagieren, Seneszenz beschleunigen und programmierten Zelltod auslösen (Sharma und Davis, 1997). Darüber hinaus tragen sie ihrerseits zur weiteren Synthese von SA bei und verstärken so die Immunreaktion (Glazebrook, 2005).

1.1.1 Die Rolle des *oxidative burst* in der pflanzlichen Abwehrreaktion

Die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies ist eine zentrale Komponente der frühen pflanzlichen Immunantwort. Einerseits können ROS direkt toxisch auf eindringende Pathogene wirken, da sie oxidative Eigenschaften besitzen und so Peptide und Nukleinsäuren des Pathogens schädigen können (Apel und Hirt, 2004; Kohen und Nyska, 2002; Mehdy, 1994). ROS sind überdies auch an der mechanischen Stabilisierung des Zellwandmaterials bei der Bildung von Papillen beteiligt (Bhuiyan *et al.*, 2009; Hüchelhoven, 2007; Ros Barceló, 1997). So stellt Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ein Oxidationsmittel für die peroxidasevermittelte Ligninsynthese dar, bei der Monolignole zu Radikalen umgesetzt werden, bevor sie ein Ligninpolymer bilden können (Davin und Lewis, 2005; Freudenberg, 1959). Weiterhin sind ROS aber auch an der Signalweiterleitung beteiligt und können als Signalmoleküle im Rahmen der SA-vermittelten Abwehr agieren (D'Autreaux und Toledano, 2007). Hierbei besteht eine positive Rückkopplung zwischen SA-Anreicherung und ROS-Produktion (Vlot *et al.*, 2009).

Der *oxidative burst* kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Beide Phasen sind durch einen schnellen Anstieg der ROS-Produktion gekennzeichnet, wobei die erste Phase innerhalb weniger Minuten nach PAMP-Erkennung startet und meist für 60 bis 180 min anhält (Lamb und Dixon, 1997). Hierbei werden zu Beginn bereits vorhandene apoplastische Enzyme genutzt und gleichzeitig die Produktion weiterer ROS-synthetisierender Enzyme induziert (Daudi *et al.*, 2012; Mehdy, 1994). Die zweite Phase

des *oxidative burst* beginnt meist 3 – 4 h nach Pathogenbefall, wenn es dem Pathogen nicht gelingt, eine kompatible Interaktion zu etablieren (Lamb und Dixon, 1997). Sie ist durch eine länger anhaltende ROS-Produktion gekennzeichnet, wobei die Menge der akkumulierten ROS stark zunimmt (Baker und Orlandi, 1995). In der Folge führt diese Reaktion zur Aktivierung einer HR und zum programmierten Zelltod im infizierten Pflanzengewebe (Torres *et al.*, 2006).

1.1.2 Die Bedeutung von Peroxidasen für den *oxidative burst*

Während des *oxidative burst* werden ROS, insbesondere Wasserstoffperoxid (H_2O_2), schnell in hohen Konzentrationen angereichert. Dies geschieht durch enzymatische Aktivität zweier verschiedener Enzymklassen: NADPH-Oxidasen und Klasse-III-Häm-Peroxidasen (Bolwell *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 2012). Membranständige NADPH-Oxidasen setzen molekularen Sauerstoff durch Reduktion eines Elektrons zu Superoxid um, das sehr instabil ist und eine kurze Halbwertszeit von < 1 s besitzt (Sawyer *et al.*, 1978). Bei Anwesenheit von Wasser kommt es zur Dismutation zum stabileren H_2O_2 , Hydroxid (OH^-) und molekularem Sauerstoff (O_2), die durch die Superoxid-Dismutase vermittelt wird (Sagi und Fluhr, 2001; Sutherland, 1991; Taylor *et al.*, 1993). Peroxidasen umfassen drei Klassen, von denen nur die Klassen I (intrazelluläre Peroxidasen) und III (sekretierte Peroxidasen) in Pflanzen vorkommen, während die Klasse II nur durch Pilze sekretiert wird (Vlasits *et al.*, 2010; Zamocky *et al.*, 2009, 2010). Klasse-III-Häm-Peroxidasen besitzen ein Häm als prosthetische Gruppe und können zwei katalytische Wege durchlaufen, den hydroxylyischen oder Oxidase-Zyklus und den peroxidativen bzw. Peroxidase-Zyklus (O'Brien *et al.*, 2012; Passardi *et al.*, 2005). Im peroxidativen Zyklus setzen sie H_2O_2 durch Dismutation zu Wasser und molekularem Sauerstoff um und agieren so als ROS-abbauende Enzyme (Zamocky *et al.*, 2012), während im hydroxylyischen Zyklus H_2O_2 bei verhältnismäßig hohem pH und unter Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels direkt aus Eisen-Superoxid gebildet werden kann (Berglund *et al.*, 2002; Bolwell *et al.*, 1999; Bolwell *et al.*, 1995; Pichorner *et al.*, 1992) (Abb. 2).

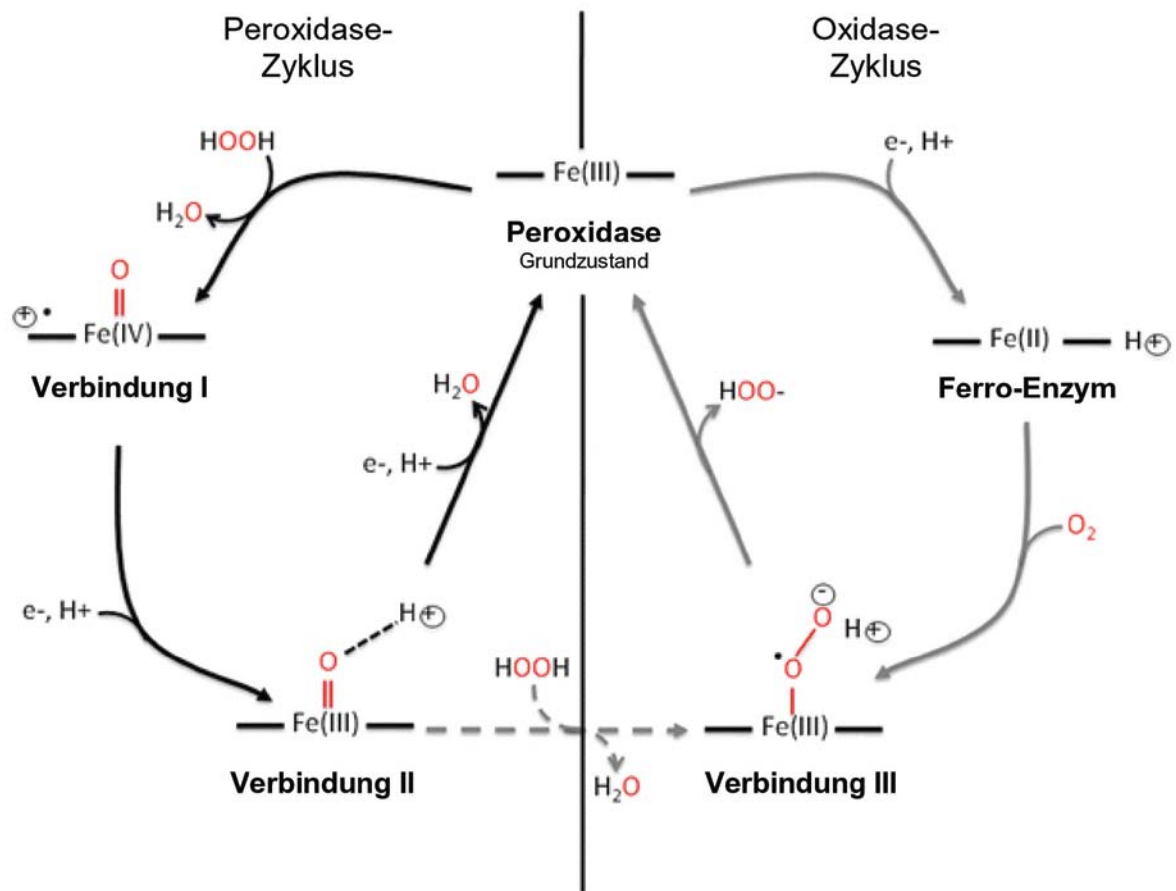


Abbildung 2: Der Oxidase/Peroxidase-Zyklus von Klasse-III-Peroxidasen

Abbau (Peroxidasezyklus) und Produktion (Oxidasezyklus) von H₂O₂ durch Klasse-III-Peroxidasen. **Peroxidasezyklus:** Im Grundzustand können Peroxidasen H₂O₂ durch Übertragen eines Sauerstoffatoms auf die Häm-Gruppe der Peroxidase abbauen, es entstehen Wasser und Verbindung I (Fe(IV)). Für die Rückkehr zum Grundzustand ist die Reaktion mit einem Reduktionsmittel (Substrat) erforderlich – es wird zunächst Verbindung II gebildet und der Grundzustand nach einer weiteren Reaktion mit einem Reduktionsmittel erreicht. **Oxidasezyklus:** Bei Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels kann die Peroxidase aus dem Grundzustand zum Ferro-Enzym (Fe(II)) reduziert werden, das nach der Reaktion mit Sauerstoff Verbindung III bildet. Durch Reaktion von Verbindung III mit einem Reduktionsmittel wird dann die Bildung von H₂O₂ katalysiert und die Peroxidase geht wieder in den Grundzustand über. Verbindung III kann auch bei hoher Konzentration von H₂O₂ unter Abgabe von Wasser direkt aus Verbindung II hervorgehen. Abbildung modifiziert nach O'Brien *et al.* (2012) und Passardi *et al.* (2005).

In Abhängigkeit von der Art des Pathogenbefalls, dem untersuchten Gewebe und dem Entwicklungsstand des einzelnen pflanzlichen Individuums ist die Produktion von H₂O₂ im *oxidative burst* entweder auf NADPH-Oxidasen oder auf Peroxidasen zurückzuführen (Bindschedler *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006). In einigen Beispielen wurde die konzertierte Aktivität beider Enzymklassen als notwendig für die Katalyse des *oxidative burst* beschrieben (Ranieri *et al.*, 2003; Tang und Smith, 2001).

Die Rolle der Peroxidasen in der Pathogenabwehr wurde in verschiedenen Pathosystemen untersucht. In Baumwollpflanzen wurde die Anreicherung von ROS durch apoplastische Peroxidasen nach Befall mit *Xanthomonas campestris* dokumentiert (Delannoy *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 1998). Auch in Reis ist eine sekretierte Peroxidase an der Abwehr von *Xanthomonas*-Infektionen beteiligt (Hilaire *et al.*, 2001). In Gartensalat (*Lactuca sativa*) konnte eine gesteigerte Peroxidaseaktivität im Rahmen lokaler Peroxidianreicherung bei einer Nichtwirts-Immunreaktion nachgewiesen werden (Bestwick *et al.*, 1998) und in der grünen Bohne *Phaseolus vulgaris* ist ebenfalls eine Peroxidase für den apoplastischen *oxidative burst* verantwortlich (Blee *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte in *Arabidopsis thaliana* durch *Silencing* der Peroxidase FBP1 eine Reduktion des *oxidative burst* und eine erhöhte Suszeptibilität gegen mikrobielle Pathogene erreicht werden (Bindschedler *et al.*, 2006). Umgekehrt führt die Überexpression einer Peroxidase in *A. thaliana* zu erhöhter Pathogenresistenz (Choi *et al.*, 2007). Es darf also als gesichert gelten, dass sekretierten Peroxidasen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung apoplastischer Immunität zukommt. Eine schematische Darstellung des Zusammenspiels von NADPH-Oxidasen und Peroxidasen während des *oxidative burst* und der Rolle von ROS in der pflanzlichen Pathogenabwehr zeigt Abbildung 3.

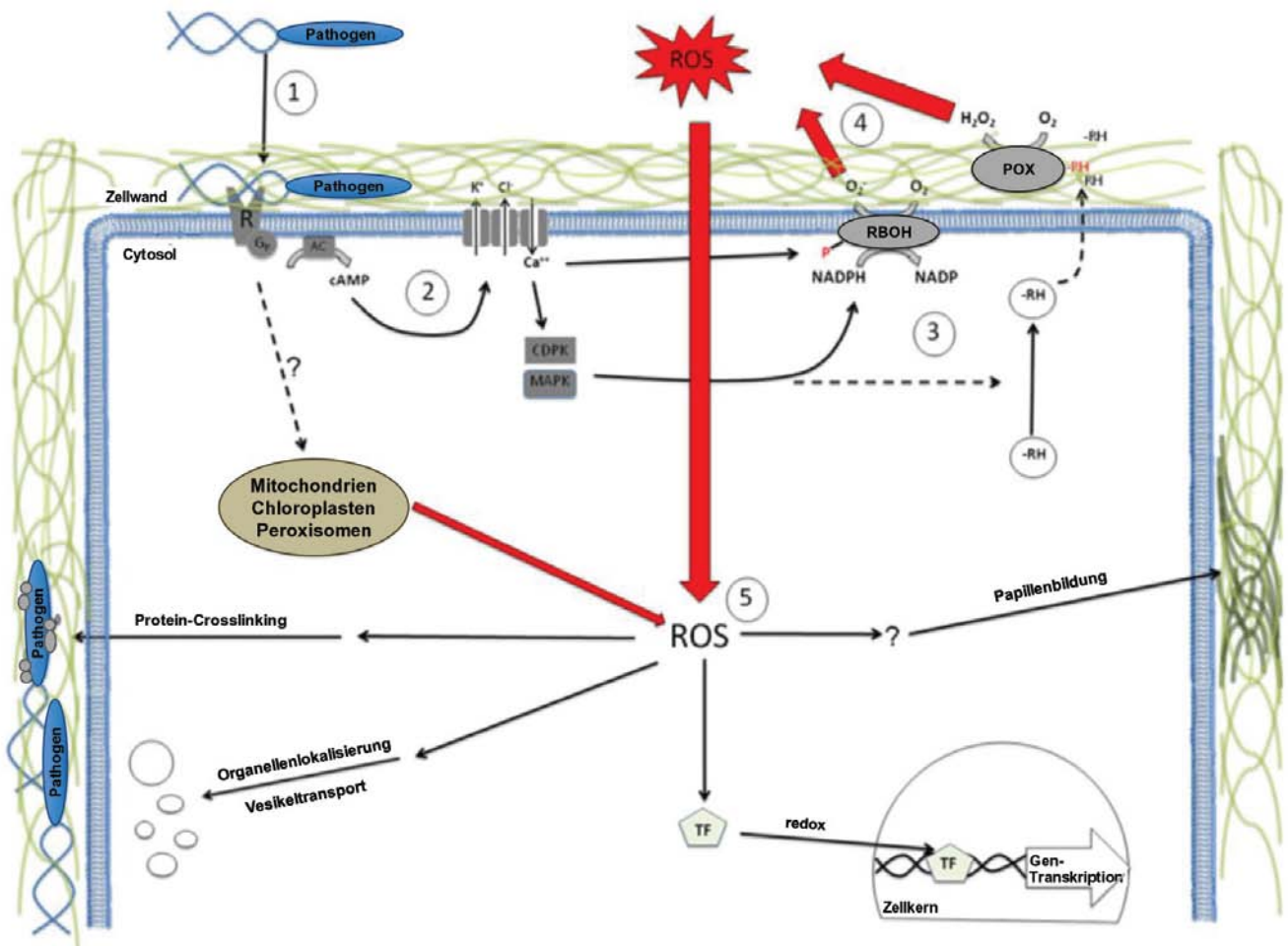


Abbildung 3: Quellen für ROS und deren Rolle in der Pathogenabwehr

1: Bei Erkennung eines Pathogens durch einen PRR wird eine Signalkaskade ausgelöst. **2:** Dies führt zur Aufnahme von Ca^{2+} und Freisetzung von Cl^- und K^+ durch die Zelle. Hierdurch steigt der extrazelluläre pH vorübergehend an. **3:** Die Aktivierung der Signalkaskaden und die gestiegene Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol induzieren die ROS-Produktion durch NADPH-Oxidasen und Peroxidasen. Dies führt zur apoplastischen Peroxidanreicherung (4). **5:** ROS diffundieren ins Cytosol und induzieren dort verschiedene Abwehrreaktionen. Darüber hinaus wirken sie direkt in der Zellwandverstärkung. ROS: reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*), R *pattern recognition receptor* (PRR), Gp G-coupled protein, MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase, CDPK: Calcium-abhängige Proteinkinase (*calcium-dependent protein kinase*), RBOH: NADPH-Oxidase (*respiratory burst oxidase homologue*), POX: Klasse-III-Peroxidase, -RH: Reduktionsmittel, TF: Transkriptionsfaktor. Abbildung modifiziert nach O'Brien *et al.* (2012).

1.2 Sekretierte Effektoren interferieren mit dem pflanzlichen Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben Pathogene Strategien entwickelt, um die Abwehrmechanismen der Wirtspflanzen außer Kraft zu setzen. So bilden phytopathogene Pilze Appressorien aus, Infektionsstrukturen, die die mechanische Barriere aus Cuticula und Zellwand überwinden, indem sie teils lytische Enzyme sekretieren und mechanischen Druck aufbauen, um die Zellwand zu durchbrechen (Deising *et al.*, 2000). Die induzierte Abwehr kann anschließend durch sekretierte Effektorproteine überwunden werden (De Wit *et al.*, 2009; Stergiopoulos und de Wit, 2009).

Bakterielle Pathogene beispielsweise injizieren Effektorproteine über ein Typ-III-Sekretionssystem in ihre Wirtszellen. Dort können die Effektoren z. B. Transkriptionslevels verändern (Thilmony *et al.*, 2006; Truman *et al.*, 2006), den intrazellulären Vesikeltransport inhibieren (DebRoy *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2006), die frühe Signaltransduktion im Rahmen von PTI verhindern, indem sie PRRs oder deren Signalweiterleitung inhibieren (Göhre und Robatzek, 2008; He *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2008) oder programmierten Zelltod unterdrücken (Abramovitch *et al.*, 2003; Fujikawa *et al.*, 2006). Phytopathogene Nematoden sekretieren Effektoren entweder in den Apoplasten oder – ähnlich des bakteriellen Typ-III-Sekretionssystems – durch ein Stilett direkt ins Cytoplasma der Pflanze (Vanholme *et al.*, 2004).

Nicht zuletzt nutzen auch filamentöse Pilze und Oomyceten Effektoren, die in den Apoplasten sekretiert werden und dort entweder direkt agieren oder ins pflanzliche Cytoplasma aufgenommen werden (Kamoun, 2006; Panstruga und Dodds, 2009). So interagiert der Effektor Avr3a des Oomyceten *Phytophthora infestans* mit der Ubiquitin-Ligase CMPG1 seiner Wirtspflanze Kartoffel, einem Bestandteil einer PCD-Abwehrreaktion. Avr3a stabilisiert CMPG1, inhibiert so dessen proteasomalen Abbau und verhindert auf diesem Wege das Absterben der Wirtszelle (Bos *et al.*, 2010). Die Aufnahme des Effektors in die Pflanzenzelle wird dabei durch eine N-terminale RxLR (Arg – x – Leu – Arg) – Signalsequenz in Kombination mit einem zusätzlichen dEER (Asp – Glu – Glu – Arg) – Motiv vermittelt (Morgan und Kamoun, 2007; Whisson *et al.*, 2007). Das RxLR-Motiv wurde überdies in weiteren Oomyceten-Effektoren gefunden und als genereller Translokationsfaktor für Effektorproteine diskutiert (Dou *et al.*, 2008; Kale *et*

al., 2010; Schornack *et al.*, 2010). Sekretierte Effektoren können innerhalb der Pflanzenzelle auch in spezifischen Kompartimenten lokalisieren. So besitzt der Effektor SNE1 aus *P. infestans* beispielsweise eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS). Für SNE1 wurde eine Funktion als Zelltodinhibitor in Tabak- und Tomatenblättern gezeigt (Kelley *et al.*, 2010). Ähnlich zu SNE1 verfügt auch der Effektor RTP1 aus dem Rostpilz *Uromyces fabae* über eine NLS. Für RTP1 konnte eine Translokation in den Kern der Pflanzenzellen nachgewiesen werden (Kemen *et al.*, 2005). Der hemibiotrophe Ascomycet *Magnaporthe oryzae*, der Auslöser des Reisbrandes, bildet beim Eindringen der invasiven Hyphe einen sog. *biotrophic interface complex* (BIC) aus, in den der Pilz ein Set aus Effektoren sekretiert (Couch und Kohn, 2002; Khang *et al.*, 2010). Für zwei dieser Effektoren, AvrPita1 und AvrPiz-t konnte eine Lokalisierung im pflanzlichen Cytoplasma und die Translokation in benachbarte Zellen nachgewiesen werden (Khang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009). Während die Funktion von AvrPita1 bisher nicht aufgeklärt wurde, weiß man von AvrPiz-t, dass es BAX-induzierten programmierten Zelltod in Reis unterdrücken kann (Li *et al.*, 2009).

Neben translozierten Effektoren wurden auch für pathogene Pilze apoplastische Effektoren beschrieben, die mit dem pflanzlichen Immunsystem interferieren. Der erste charakterisierte Effektor eines biotrophen Pilzes ist Avr9 aus *Cladosporium fulvum*, dem Erreger des Blattschimmels auf Tomatenpflanzen (Thomma *et al.*, 2005). Während die molekulare Funktion von Avr9 noch nicht bekannt ist, weiß man aus Untersuchungen mit resistenten Tomatenlinien, dass ein Resistenzgen existiert, das für ein Protein kodiert, das Avr9 erkennen und eine HR auslösen kann (Van den Ackerveken *et al.*, 1992). Demnach ist Avr9 gleichzeitig ein gutes Beispiel für eine Gen-für-Gen-Interaktion im Rahmen der pflanzlichen Abwehr. Aus der Interaktion von *C. fulvum* mit Tomate sind aber auch Effektoren bekannt, die die pflanzliche Abwehr inhibieren. So bindet der Effektor Avr2 an apoplastische Cysteinproteasen und inhibiert deren enzymatische Aktivität im Rahmen der frühen Immunantwort (van Esse *et al.*, 2008). Apoplastische Effektoren können die pflanzliche Abwehr aber auch indirekt unterdrücken, indem sie die Erkennung durch PRRs verhindert. Pflanzen sekretieren neben anderen Enzymen auch Chitinasen, die die pilzliche Zellwand angreifen und auf diese Weise zur Freisetzung von Chitin-Oligomeren beitragen, die als PAMPs agieren und in der Folge eine pflanzliche Immunantwort auslösen oder verstärken können. Um dies zu unterbinden, sekretiert *C. fulvum* die Effektoren Avr4 und Ecp6. Avr4 verfügt über eine Chitin-Bindedomäne und bindet an das Chitin in der pilzlichen Zellwand; dadurch wird der Abbau durch Chitinasen verhindert (van den Burg *et al.*, 2004). Analog dazu besitzt Ecp6 eine LysM-Domäne. LysM ist eine Chitin-Bindedomäne mit einer hohen Affinität für kurze Chitin-Oligomere und vermittelt die Bindung von Ecp6 an freigesetzte Chitin-Oligomere, die nun nicht mehr

von PRRs der Pflanze detektiert werden können (de Jonge und Thomma, 2009; de Jonge *et al.*, 2010). So können Effektoren eine Erkennung durch das pflanzliche Immunsystem verhindern, ohne direkt mit dessen Komponenten zu agieren.

1.2.1 Spezifität und Konservierung von Effektorproteinen

Bedingt durch die Spezifität von Gen-für-Gen-Interaktionen und die Koevolution mit der jeweiligen Wirtspflanze sind sekretierte Effektoren und deren Interaktionspartner einem hohen diversifizierenden Selektionsdruck ausgesetzt (Hogenhout *et al.*, 2009; Misas-Villamil und van der Hoorn, 2008). So wurde beispielsweise für Glucanasen aus Soja eine hohe diversifizierende Selektion nachgewiesen (Bishop *et al.*, 2005) und auch der Glucanaseinhibitor GIP1 aus *P. infestans* unterliegt diversifizierender Selektion (Damasceno *et al.*, 2008). Für pflanzliche Proteasen konnte gleichfalls eine Diversifizierung gezeigt werden: die Papain-ähnliche Cysteinprotease C14 aus der Kartoffel spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen das Pathogen *P. infestans*. *P. infestans* sekretiert zur Unterdrückung dieser und anderer Proteasen die Effektoren EPIC1 und EPIC2b (Kaschani *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2007). Der daraus resultierende Selektionsdruck auf C14 führt zu einer Diversifizierung von C14 (Kaschani *et al.*, 2010). Ausgehend von diesen Beobachtungen nimmt man an, dass Effektorproteine und deren pflanzliche Interaktionspartner in einer bestimmten Form jeweils nur in einem bzw. wenigen nah verwandten Pathosystemen vorkommen.

Da verschiedene Pathogene, die die gleiche Wirtspflanze befallen, auch die gleichen Immunreaktionen überwinden müssen, kommt es jedoch auch vor, dass sich in verschiedenen Pathosystemen ähnliche Effektoren ausbilden, die die gleiche Funktion übernehmen: die Proteaseinhibitoren EPIC1 und EPIC2b aus dem Oomyceten *P. infestans* hemmen neben C14 auch die Protease Rcr3^{pim} aus Tomate (Song *et al.*, 2009). Der Ascomycet *C. fulvum* sekretiert den Proteaseinhibitor Avr2, der ebenfalls in der Lage ist, die Aktivität von Rcr3^{pim} zu inhibieren (Rooney *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009). An diesem Beispiel zeigt sich, dass der Selektionsdruck auch zur Ausbildung analoger Strukturen in Pathogenen aus verschiedenen Klassen bzw. Reichen führen kann.

Da die Komponenten der basalen pflanzlichen Abwehr sich in allen Pflanzen zu einem gewissen Grad ähneln, besteht darüber hinaus die Möglichkeit konservierter universeller Infektionsmechanismen, die mit der gegebenen Abwehrreaktion interferieren. Ein Beispiel hierfür stellt das sekretierte Protein MC69 aus *M. oryzae* dar. MC69 lokalisiert im Apoplasten und vermittelt die Virulenz von *M. oryzae* auf der monokotylen Wirtspflanze

Reis (Saitoh *et al.*, 2012). Interessanterweise existieren Homologe von MC69 in vielen weiteren Pilzen, darunter *Colletotrichum orbiculare*, *Glomerella graminicola*, *Neurospora crassa* und *Fusarium oxysporum* (Saitoh *et al.*, 2012). *C. orbiculare* ist der Erreger von Anthraknose auf Gurke, einem dikotylen Pflanzenwirt. Auch *C. orbiculare* exprimiert MC69 bei der Infektion des Wirtsgewebes, und auch in dieser Interaktion ist die Funktion von MC69 essentiell für die pathogene Entwicklung (Saitoh *et al.*, 2012). Das bedeutet, dass der Wirkmechanismus einiger Effektoren in verschiedenen Pathosystemen auch über die Grenze zwischen ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen konserviert sein kann.

1.1. Brandpilze und *Ustilago maydis* als Modellsystem

Die Gruppe der Brandpilze (Ustilaginomycotina) aus der Abteilung der Basidiomyceten besteht aus 3 Klassen obligat biotropher Pathogene: den Ustilaginomycetes, den Exobasidiomycetes und den Enterrhizomyzeten (Begerow *et al.*, 2006). Die Ordnung der Ustilaginales umfasst ca. 1100 Arten und ist damit die größte innerhalb der Brandpilze. Die meisten Brandpilze parasitieren Blütenpflanzen, darunter auch wirtschaftlich bedeutende Gräser wie Gerste (*Ustilago nuda*, *Ustilago hordei*), Hafer (*Ustilago avenae*), Mais (*Ustilago maydis*, *Sporisorium reilianum*), Weizen (*Ustilago tritici*) und Zuckerrohr (*Sporisorium scitamineum*), wo sie zur Ausbildung von melanisierten Teliosporen in den Fruchtständen der Pflanzen führen. Die dunkle Färbung der Sporen verleiht den Pflanzen ein verbranntes Aussehen, daher begründet sich der Name Brandpilze. Charakteristisch für Brandpilze ist, dass eine Infektion immer durch eine dikaryotische Hyphe erfolgt, die aus der Fusion zweier kompatibler haploider Zellen hervorgehen (Bakkeren *et al.*, 2008). Nur dieses Dikaryon ist zur Infektion der Wirtspflanze in der Lage. Da Brandpilze meist die Fruchtstände von Nutzpflanzen zur Verbreitung ihrer Teliosporen umwandeln und somit weltweit zu beträchtlichen Ernteaufschlägen beitragen, besteht ein zunehmendes wirtschaftliches Interesse an der Aufklärung ihrer Infektionsmechanismen und der Erarbeitung möglicher Abwehrstrategien (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002).

1.3.1 Der Maisbeulenbrand *U. maydis*

Der bekannteste Vertreter der Brandpilze ist der Erreger des Maisbeulenbrands *Ustilago maydis* (Kahmann *et al.*, 2000). *U. maydis* infiziert ausschließlich Maispflanzen (*Zea mays*) sowie deren Urform Teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana*) und induziert die

Bildung von Pflanzengallen, den sog. Tumoren, an allen überirdischen Teilen der Pflanze (Abb. 4). Die Teliosporen reifen in den Tumoren heran und werden durch Aufreißen der Tumore freigesetzt (Christensen, 1963). Dies stellt eine Besonderheit innerhalb der Ustilaginomycetes dar, die sonst ausschließlich die Blütenstände der Wirtspflanzen zur Sporenbildung nutzen.

U. maydis stellt heute ein wichtiges Modellsystem für genetische, cytologische und phytopathologische Fragestellungen dar (Banuett, 1995; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002; Steinberg und Perez-Martin, 2008). Dies hat mehrere Ursachen: einerseits hat *U. maydis* einen biphasischen Lebenszyklus mit einer haploiden, saprophytischen und einer dikaryotischen, obligat biotrophen Phase (Kahmann *et al.*, 2000). In seinem saprophytischen Stadium (den sog. Sporidien) kann *U. maydis* leicht unter axenischen Bedingungen im Labor kultiviert werden. Dies hat dazu beigetragen, dass beispielsweise die homologe Rekombination von DNA an *U. maydis* als frühem genetischen Modellorganismus untersucht werden konnte (Holliday, 1961, 1964, 2004). Zudem erweist es sich als Vorteil, dass die pathogene Entwicklung von *U. maydis* unter Laborbedingungen innerhalb eines Monats von der Infektion bis zur Sporenrufe und -keimung durchlaufen werden kann (Banuett, 1995). Dies ermöglicht es, phytopathologische Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen.

Des Weiteren wurden für *U. maydis* konstitutive und induzierbare Promotoren charakterisiert (Brachmann *et al.*, 2001; Zarnack *et al.*, 2006) und sowohl integrative als auch selbstreplizierende Plasmide beschrieben, die die genetische Manipulation der Sporidien ermöglichen (Tsukuda *et al.*, 1988). So können u. a. Fluoreszenzmarker zur subzellulären Proteinlokalisierung in den Pilz eingeführt werden (Spellig *et al.*, 1996). Nicht zuletzt führten die Entschlüsselung des 20,5 Mbp umfassenden Genoms (Kämper *et al.*, 2006) und die Etablierung von Transkriptomanalysen durch DNA-Mikroarrays (Eichhorn *et al.*, 2006) dazu, dass sich *U. maydis* auch als Modellsystem in der molekularen Phytopathologie etablieren konnte (Basse und Steinberg, 2004; Bölker, 2001; Brefort *et al.*, 2009; Djamei und Kahmann, 2012; Kahmann *et al.*, 2000).

Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass *U. maydis* nicht ausschließlich als Schädling angesehen wird. Vielmehr gelten die *Ustilago*-induzierten Pflanzentumore in Mittel- und Südamerika, vor allem in Mexiko, als schmackhafte Delikatesse namens Huitlacoche (Juarez-Montiel *et al.*, 2011).



Abbildung 4: Tumorbildung auf Mais, induziert durch *U. maydis*
(linker Abbildungsteil aus Djamei und Kahmann (2012))

So kommt es, dass in dieser Region Maisfelder zur Huitlacoche-Produktion bewusst mit *U. maydis* infiziert werden und außerdem an der Verbesserung von Ertrag und Geschmack der Tumore geforscht wird (Pataky und Chandler, 2003; Valverde *et al.*, 1995). Somit bestehen wirtschaftliche Interessen an *U. maydis* nicht nur an der Ertragsminderung der Maisernte durch Infektionen sondern auch an den Tumoren als Nahrungsmittel.

1.3.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Der biphasische Lebenszyklus von *U. maydis* ist gegliedert in eine saprophytische haploide und eine infektiöse dikaryotische Phase. In der haploiden Phase vermehren sich die Sporidien asexuell durch Knospung und können so schnell große Individuenzahlen erreichen – unter optimalen Bedingungen beträgt die Verdopplungszeit von Sporidien ca. 2 h. Erst wenn zwei kompatible Sporidien verschiedenen Paarungstyps auf einer geeigneten Pflanzenoberfläche aufeinandertreffen, beginnt der infektiöse Teil des Lebenszyklus (Abb. 5). Zunächst wird dabei die gegenseitige Erkennung der Paarungspartner durch ein Pheromon/Rezeptor-System vermittelt, das durch den biallelischen Paarungstyplokus *a* kodiert wird (Bölker *et al.*, 1992; Gillissen *et al.*, 1992; Rowell, 1955). Nach der Pheromonperzeption erfolgt die Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zu wachsen und schließlich fusionieren (Snetselaar *et al.*, 1996). Nach der Fusion erfolgt die Aktivierung des zweiten, multiallelischen Paarungstyplokus *b*. Dieser kodiert zwei verschiedene Homeodomänenproteine, *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die nur dimerisieren, wenn sie von

verschiedenen Allelen kodiert werden und für die Filamentbildung essentiell sind (Brachmann *et al.*, 2001). Das so entstehende Heterodimer agiert als Transkriptionsfaktor für ca. 350 pathogenitätsrelevante Gene (Bakkeren *et al.*, 2008; Brachmann *et al.*, 2001). Im Anschluss erfolgt ein Zellzyklusarrest, der erst nach erfolgreicher Infektion der Wirtspflanze wieder aufgehoben wird, d. h. eine Rückkehr zu saprophytischem Wachstum ist in dieser Phase des Lebenszyklus nicht mehr möglich. Das gebildete dikaryotische Filament wächst nun auf der Pflanzenoberfläche, wobei nur die Spitzenzelle mit Cytoplasma gefüllt ist und durch den regelmäßigen Einzug von Septen von leeren Hyphenabschnitten am distalen Ende abgetrennt wird (Banuett und Herskowitz, 1994). An einer geeigneten Stelle der Pflanzenoberfläche, die durch die Stimuli Hydrophobizität und den Gehalt bestimmter Fettsäuren determiniert wird (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009), erfolgt die Bildung der Infektionsstruktur, des sog. Appressoriums (Snetselaar und Mims, 1992). Durch die Sekretion lytischer Enzyme wird die Zellwand der Pflanze abgebaut und mit einer invasiven Hyphe durchbrochen (Schirawski *et al.*, 2005). Dabei bleibt die Plasmamembran der Pflanze intakt und umschließt die invaginierende Hyphe eng (Doehlemann *et al.*, 2008b; Snetselaar und Mims, 1993). Auf diese Weise entsteht eine apoplastische biotrophe Interaktionszone zwischen Pilz und Pflanze, in der zahlreiche sekretierte Vesikel, aller Wahrscheinlichkeit nach pilzlichen Ursprungs, akkumulieren (Bauer *et al.*, 1997). Als biotrophes Pathogen sekretiert *U. maydis* Effektoren in diese Interaktionszone, die die pflanzlichen Abwehrreaktionen unterdrücken und Genexpressionsmuster der Wirtspflanze modifizieren (Doehlemann *et al.*, 2008a, b). Nach erfolgreicher Etablierung einer biotrophen Interaktion wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und der Pilz beginnt mit der Kolonisierung von Epidermis, Mesophyll und vaskulärem Gewebe der Maispflanze (Banuett und Herskowitz, 1996). Nach drei bis vier Tagen kommt es zu einer massiven Proliferation der Hyphen im Apoplasten und bereits nach fünf Tagen können frühe Stadien der Tumorentwicklung auf der Pflanzenoberfläche beobachtet werden. Im Laufe der Tumorentwicklung kommt es zu einer umfassenden Umprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus, so dass infizierte Bereiche zu *sink*-Gewebe werden, um dem Pilz die für die Proliferation benötigte Energie zur Verfügung zu stellen (Doehlemann *et al.*, 2008a; Doehlemann *et al.*, 2008b). Schließlich fragmentieren die Hyphen in den Tumoren, lagern Melanin in die Zellwand ein und werden so zu Teliosporen (Banuett und Herskowitz, 1996). Im Laufe dieser Entwicklung kommt es zur Karyogamie, so dass der Pilz in seiner Überdauerungsform eine diploide Kernphase aufweist. Nach ihrer Freisetzung können die Teliosporen durch biotische und abiotische Vektoren verbreitet werden und behalten ihre Keimfähigkeit über viele Jahre (Christensen, 1963). Unter geeigneten Bedingungen kommt es zur Auskeimung der Sporen. Nach einer Meiose

bildet sich eine Metabasidie, aus der jeweils vier Sporidien hervorgehen, die Basidiosporen entsprechen.

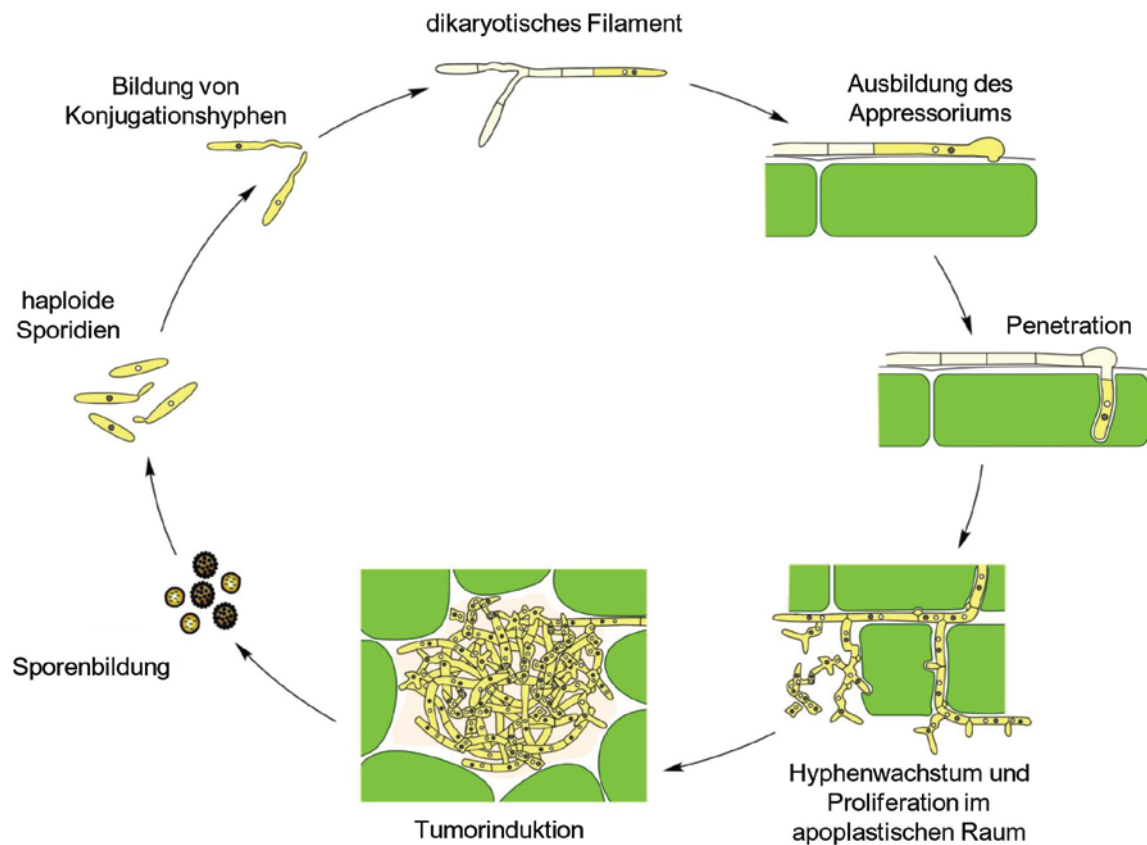


Abbildung 5: Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Schematische Darstellung des diphasischen Lebenszyklus von *U. maydis*. Die saprobe Phase beginnt mit der Sporenbildung, aus der die haploiden Sporidien hervorgehen, die sich durch hefeartige Knospung vermehren. Auf einer geeigneten Pflanzenoberfläche wird ein dikaryotisches Filament durch die Fusion zweier kompatibler Sporidien gebildet und die biotrophe Phase beginnt mit der Ausbildung eines Appressoriums, das die pflanzliche Epidermis penetriert. Es kommt zur Besiedelung des Pflanzengewebes im apoplastischen Raum und schließlich zur Proliferation der Hyphen. Dies geht mit der Induktion tumorartigen Wachstums des Pflanzengewebes einher. In den Tumoren werden durch Karyogamie und Fragmentierung der Hyphen diploide Teliosporen gebildet. Diese werden durch Aufreißen der Tumore freigesetzt und durch biotische und abiotische Vektoren verbreitet. Abbildung modifiziert nach Doehlemann *et al.* (2008b) und Kämper *et al.* (2006).

1.3.3 Sekretierte Effektoren von *U. maydis*

Zur Interaktion mit seiner Wirtspflanze nutzt *U. maydis* sekretierte Effektoren. Diese sind meist in Genclustern organisiert und nur während der Besiedelung der Wirtspflanze transkriptionell hochreguliert (Doehlemann *et al.*, 2008a; Kämper *et al.*, 2006).

Das Genom von *U. maydis* weist mehrere Gencluster auf, die für sekretierte Proteine kodieren (Kämper *et al.*, 2006; Schirawski *et al.*, 2010). In einer *in-silico* Analyse wurden 554 potentiell sekretierte *U. maydis* – Proteine identifiziert, von denen für 168 eine enzymatische Funktion zugeschrieben wurde, während für 386 Proteine keine Vorhersage getroffen werden konnte (Mueller *et al.*, 2008). Nur für wenige dieser sekretierten Proteine wurde bisher eine Funktion beschrieben, allerdings befinden sich darunter auch Effektoren, die essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* sind. So weiß man bereits, dass der Effektor Pit2 zusammen mit dem Transmembranprotein Pit1 eine Rolle in der Tumorbildung spielt (Doehlemann *et al.*, 2011). Ein weiteres sekretiertes Protein von *U. maydis*, für das bereits eine Funktion beschrieben wurde, ist die sekretierte Chorismatmutase Cmu1, die von den Pflanzenzellen aufgenommen wird, durch Plasmodesmata von Zelle zu Zelle transferiert wird und diese durch *metabolic priming* für die Infektion empfänglich macht (Djamei *et al.*, 2011). Dabei greift Cmu1 in den Shikimisäureweg (Knaggs, 2003) ein und katalysiert die Umwandlung von Chorismat zu Prephenat. Dies führt dazu, dass weniger Chorismat für die Synthese von SA zur Verfügung steht und inhibiert so die SA-abhängige Abwehr (Djamei *et al.*, 2011). Bisher ist jedoch nur ein Effektor beschrieben, der als essentiell für die Besiedelung der Maispflanze durch *U. maydis* gilt: Pep1 (*protein essential during penetration 1*) (Doehlemann *et al.*, 2009). Das *pep1*-Gen (*um01987*) ist nicht in einem Gencluster lokalisiert und wird spezifisch während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*, nicht aber in der saprophytischen Phase des Lebenszyklus exprimiert (Doehlemann *et al.*, 2009). Deletionsmutanten von *pep1* sind apathogen und nicht in der Lage, das Wirtsgewebe zu besiedeln (Abb. 6). Vielmehr lösen sie bei Penetrationsversuchen eine starke pflanzliche Immunantwort aus, die zu programmiertem Zelltod führen kann (Doehlemann *et al.*, 2009). Infolgedessen ist ein makroskopischer Phänotyp von $\Delta pep1$ -Infektionen in Form nekrotischer Läsionen auf der Blattoberfläche sichtbar (Abb. 6 A).

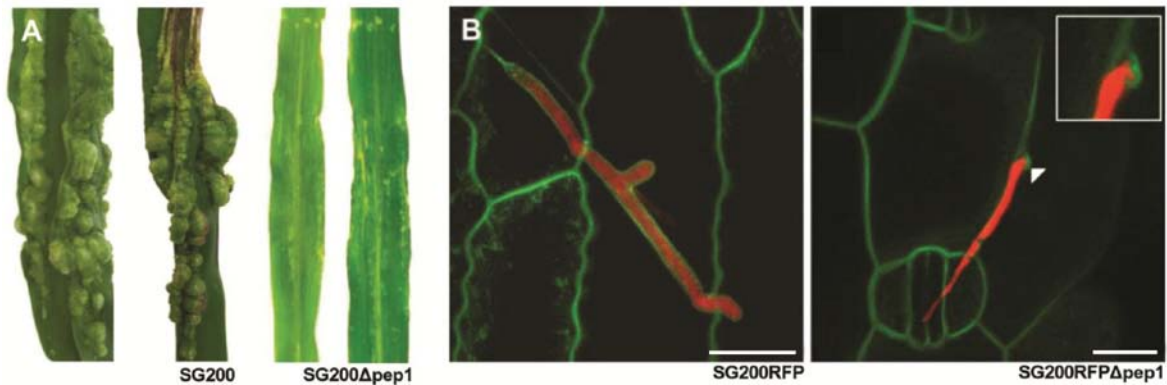


Abbildung 6: Deletionsmutanten von *pep1* sind apathogen

A: Tumorbildung auf Blättern von Maiskeimlingen, 12 dpi (*days post infection*). Der Kontrollstamm SG200 induziert die Bildung von großen Tumoren, während die *pep1*-Deletionsmutante SG200 Δ *pep1* pflanzliche Abwehrreaktionen in Form von Nekrosen (braune Blattbereiche) auslöst. **B:** Konfokale Abbildung von *U. maydis* auf Maisblättern. Der Kontrollstamm SG200RFP (Rotkanal: cytoplasmatisch exprimiertes RFP) wächst intrazellulär in Maisepidermiszellen und invaginiert die pflanzliche Plasmamembran (Grünkanal: GFP-Fusion des membranständigen Auxintransporters PIN1). Der *pep1*-Deletionsmutante gelingt keine Penetration der Epidermiszelle, die Infektion arretiert nach dem Durchbruch der Zellwand. Maßstabsbalken: 15 μ m. Abbildungsteil B modifiziert nach Döhlemann *et al.* (2009).

In mikroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Pep1 in der biotrophen Interaktionszone lokalisiert und nicht von der Pflanzenzelle aufgenommen wird. Weiterhin konnte an den Penetrationsstellen die Akkumulation von ROS und die Ausbildung von Papillen beobachtet werden (Doehlemann *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Wildtypinfektionen induziert die *pep1*-Deletionsmutante nicht den JA-Signalweg, sondern es konnte die Aktivierung SA-abhängiger Abwehrreaktionen beobachtet werden. Dies ist typisch für eine inkompatible Interaktion (Doehlemann *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist die Funktion von Pep1 nicht auf das *U. maydis* / Mais – Pathosystem beschränkt: Auch der verwandte Gerstenhartbrand *Ustilago hordei* besitzt ein *pep1*-Ortholog und auch dieses codiert für einen sekretierten Effektor, der essentiell für die Virulenz des Pathogens ist (Doehlemann *et al.*, 2009). Das deutet auf eine funktionelle Konservierung des Effektors Pep1 hin. Bislang war jedoch nicht bekannt, welche Funktion Pep1 in der biotrophen Interaktion zukommt und inwieweit diese Funktion tatsächlich in anderen Pathosystemen konserviert ist.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der biologischen Funktion des sekretierten Effektorproteins Pep1 aus *Ustilago maydis*. Zu Beginn der Arbeiten war bereits bekannt, dass die Deletion des für Pep1 codierenden Gens *um01987* zu einem vollständigen Pathogenitätsverlust auf der Wirtspflanze Mais führt, jedoch waren keine Rückschlüsse auf die Funktion dieses Effektors anhand der Aminosäuresequenz möglich (Doehlemann *et al.*, 2009). Durch mikroskopische Lokalisierungs- und Interaktionsstudien sowie funktionelle biochemische und molekularbiologische Untersuchungen sollten pflanzliche Interaktionspartner identifiziert und die Rolle von Pep1 in der biotrophen Interaktion aufgeklärt werden. Weiterhin lagen Hinweise auf eine funktionelle Konservierung von Pep1 in verwandten Pathosystemen vor. Es sollte daher untersucht werden, ob und inwieweit die Funktion von Pep1 in weiteren Pathosystemen konserviert ist.

2. Ergebnisse

2.1 Funktionelle Charakterisierung des sekretierten Effektors Pep1 aus *Ustilago maydis*

In dieser Arbeit wurde das sekretierte Effektorprotein Pep1 aus *Ustilago maydis* mikroskopisch und biochemisch charakterisiert. Es war zuvor bereits beschrieben worden, dass Pep1 in die biotrophe Interaktionszone der Wirtspflanze sekretiert wird und dort verbleibt. Dies war konfokalmikroskopisch mittels eines C-terminal mCherry-markierten Pep1-Fusionsproteins sowie durch Immunlokalisation eines C-terminal HA-markierten Pep1-Fusionsproteins gezeigt worden (Doehlemann *et al.*, 2009). Weiterhin war gezeigt worden, dass Deletionsmutanten von *pep1* in *U. maydis* nicht in der Lage sind, Epidermiszellen von Mais erfolgreich zu kolonisieren, vielmehr führt ein Penetrationsversuch zu lokalen Abwehrreaktionen der Pflanze (Doehlemann *et al.*, 2009).

2.1.1 Bestätigung der Lokalisierung von Pep1

Für die funktionelle Charakterisierung von Pep1 war es zunächst erforderlich, die apoplastische Lokalisierung von Pep1 zu bestätigen, um so Rückschlüsse auf potentielle Interaktionspartner ziehen zu können und eine fehlerhafte Lokalisierung durch Abspaltung der C-terminalen Markierungen im Rahmen posttranslationaler Modifikation auszuschließen. Hierzu wurde ein Konstrukt für ein N-terminal mCherry-markiertes Pep1-Fusionsprotein erzeugt und durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus von SG200 Δ pep1 integriert. Der resultierende Stamm SG200-mCherry:pep1 wurde in 7 Tage alte Maiskeimlinge des Kultivars (*cultivar, cv*) *Early Golden Bantam* infiziert und die Lokalisierung 48 hpi (*hours post infection*) konfokalmikroskopisch untersucht. Als Vergleich diente eine Infektion mit dem bekannten Stamm SG200pep1:gfpR (Doehlemann *et al.*, 2009). In beiden Fällen akkumuliert das Fluoreszenzsignal in der Peripherie der intrazellulär wachsenden Hyphen, wobei die höchste Signalintensität nahe der Hyphenspitze beobachtet werden konnte (Abb. 7). An Zell/Zell-Übergängen wurde dabei eine Diffusion des Fluoreszenzsignals im apoplastischen Raum zwischen den

beiden penetrierten Zellen sichtbar (Abb. 7 B). So konnte die Lokalisierung von Pep1 in der biotrophen Interaktionszone und im Apoplasten infizierter Zellen bestätigt werden, d. h. die biotrophe Interaktionszone konnte für die funktionellen Untersuchungen als Wirkungsort von Pep1 angenommen werden.

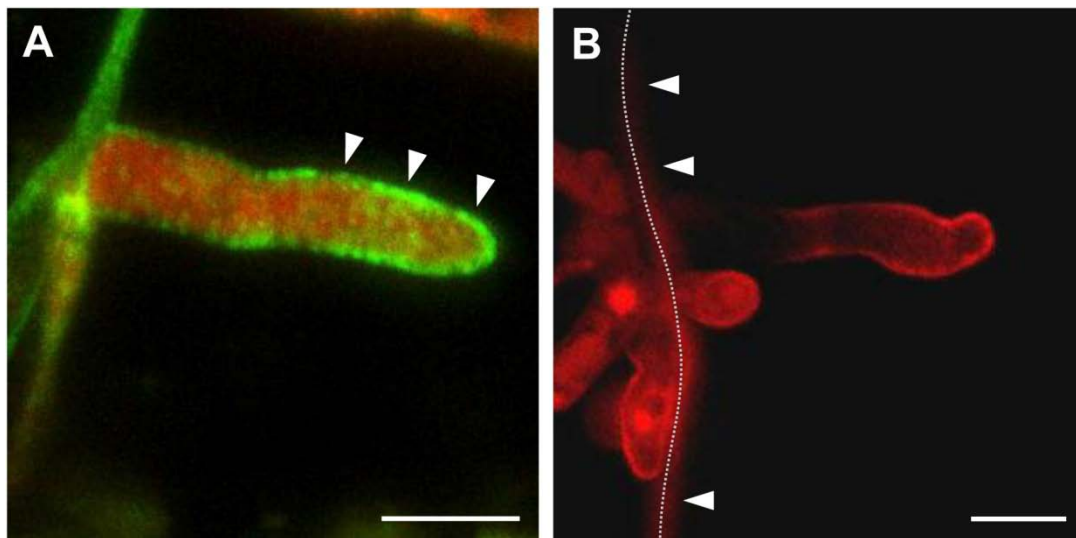


Abbildung 7: Pep1 lokalisiert in der biotrophen Interaktionszone

Konfokale Aufnahme von markiertem Pep1-Protein *in planta*, 48 hpi. **A:** C-terminal GFP-markiertes Pep1 (Grünkanal) lokalisiert in der Peripherie der intrazellulär wachsenden Hyphe; das stärkste Signal ist an der Hyphenspitze sichtbar (Pfeilspitzen). Das Cytoplasma der Hyphenzelle ist durch RFP markiert (Rotkanal), so dass die extrazelluläre Lokalisierung von Pep1 ersichtlich wird. **B:** N-terminal mCherry-markiertes Pep1 (Rotkanal) lokalisiert ebenfalls in der Peripherie der biotrophen Hyphe, wobei das stärkste Signal an der Hyphenspitze sichtbar ist. Darüber hinaus kann an einem Zell/Zell-Übergang (punktirierte Linie) beobachtet werden, dass das Fluoreszenzsignal auch im apoplastischen Raum zwischen zwei benachbarten Zellen nahe der Hyphe sichtbar ist (Pfeilspitzen). Dies deutet auf eine Diffusion von Pep1 im apoplastischen Raum hin. Maßstabsbalken: 5 μ m.

2.1.2 Mikroskopische Charakterisierung der pflanzlichen Abwehrreaktion

Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung von Pep1 wurde zunächst die pflanzliche Immunantwort auf Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante untersucht. Hierzu wurden konfokalmikroskopische Studien mit den Stämmen SG200RFP und SG200~~pep1~~RFP durchgeführt. Diese wurden in 7 Tage alte Maiskeimlinge infiziert und die Proben nach 24 h bzw. 48 h geerntet und mit Anilinblau gefärbt, um die Zellwandkomponente Callose zu markieren. Hierbei wurde ersichtlich, dass die Wirtspflanze direkt bei Penetration durch *U. maydis* mit der Auflagerung von Callose an die Zellwand unterhalb der Penetrationsstelle beginnt; dies wurde durch ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Blaukanal sichtbar, das an Penetrationsstellen auftrat. In der SG200-Infektion ist jedoch nur eine örtlich stark begrenzte Struktur direkt an der Penetrationsstelle sichtbar

(Abb. 8 A), an penetrierten Hyphen ist kein oder nur wenig Signal sichtbar (Abb. 8 A & C). Dagegen sind die Hyphen in der Infektion mit SG200 von einem starken Fluoreszenzsignal umgeben (Abb. 8 B). Dies deutet auf einen Einschluss der Hyphen durch Zellwandmaterial hin, die Pflanze bildet also als Abwehrreaktion Papillen aus. In einigen Fällen wurde beobachtet, dass *U. maydis* nach einem erfolglosen Penetrationsversuch ein weiteres Appressorium an einer anderen Stelle der Pflanzenoberfläche bildet, das wiederum eine Papillenbildung auslöst (Abb. 8 D).

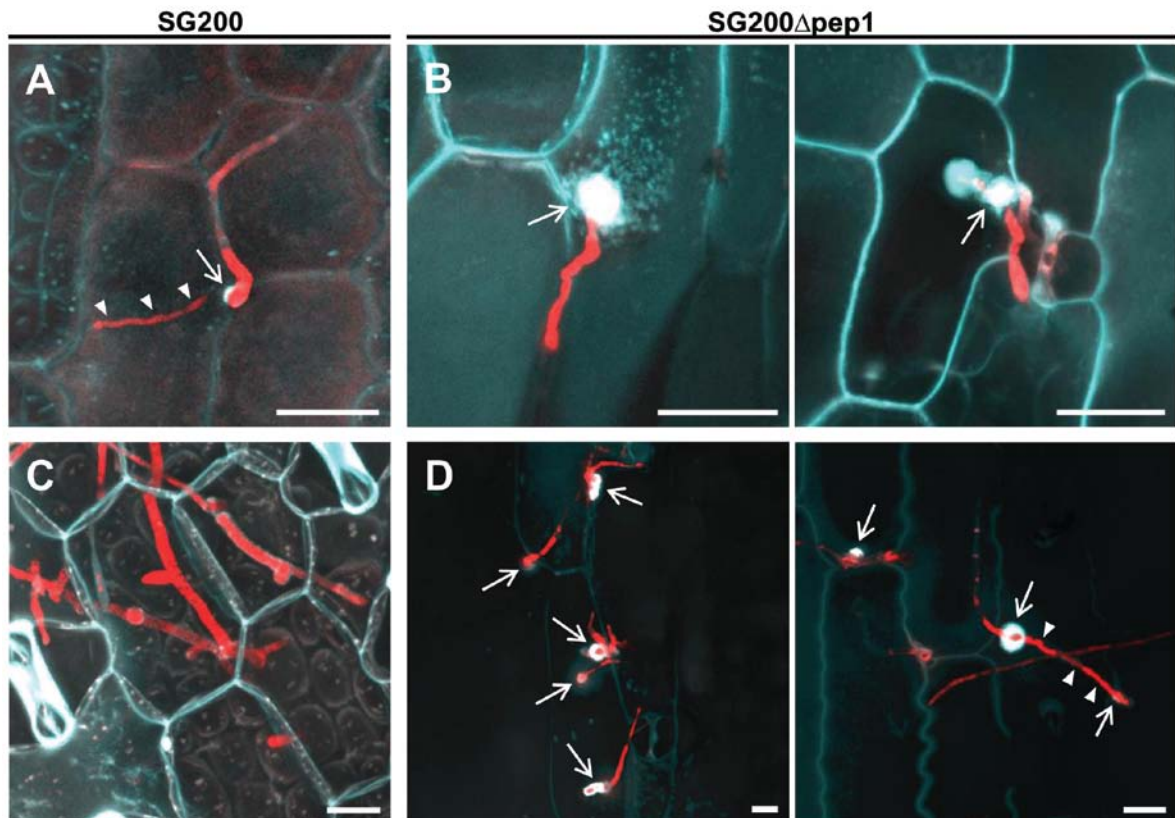


Abbildung 8: Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante lösen Papillenbildungen in Mais aus

Mit *U. maydis* infiziertes Maisgewebe 24 (A & B) bzw. 48 hpi (C & D). Der Rotkanal zeigt die Fluoreszenz von cytoplasmatisch in *U. maydis* exprimiertem RFP, der Cyankanal zeigt die Fluoreszenz von Anilinblau. **A:** Appressorium (Pfeil) und penetrierende Hyphe (Pfeilspitzen) von SG200RFP. Die Anilinblaufärbung macht eine fokale Akkumulation von Zellwandmaterial direkt unterhalb des Appressoriums sichtbar, die bei erfolgreicher Etablierung der Biotrophie und intrazellulärem Hyphenwachstum unterdrückt wird. **B:** Penetrationsversuche von SG200 Δ pep1RFP. Die Färbung zeigt die Bildung von Papillen unterhalb von Appressorien (linkes Panel, Pfeil) oder um kurze penetrierende Hyphen (rechtes Panel, Pfeil). **C:** Mit *U. maydis* besiedelte Epidermisschicht. Die Hyphen wachsen, ohne eine sichtbare Abwehrreaktion auszulösen. **D:** Auch nach 48 h sind nur erfolglose Penetrationsversuche sichtbar, die eine Papillenbildung induzieren (Pfeile). In manchen Fällen wächst die Hyphe nach einem Penetrationsversuch auf der Pflanzenoberfläche weiter (Pfeilspitzen) und bildet ein weiteres Appressorium aus, das ebenfalls eine Papillenbildung induziert. Maßstabsbalken: 10 μ m. (Anm.: Unterschiedliche Intensität des Anilinblausignals in den Zellwänden ist auf schwankende Färbungseffizienz sowie verschiedene Schichtdicke der den Einzelbildern zugrundeliegenden konfokalen Aufnahmen zurückzuführen.)

Da für die Lignifizierung von Zellwandmaterial im Rahmen der Papillenbildung reaktive Sauerstoffspezies benötigt werden (Davin und Lewis, 2005; Freudenberg, 1959) und bereits zuvor eine erhöhte ROS-Produktion in mit *pep1*-Deletionsmutanten infizierten Zellen beobachtet worden war (Doehlemann *et al.*, 2009), wurde die Akkumulation von ROS in infizierten Maisepidermiszellen untersucht. Hierzu wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Zechmann (Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich) transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen durchgeführt und dabei die Anreicherung von ROS mit CeCl_3 markiert. CeCl_3 bildet in Anwesenheit von H_2O_2 ein elektronendichtes Präzipitat, das in der TEM-Analyse als dunkle Flecken visualisiert wird (Bestwick *et al.*, 1997; Wi *et al.*, 2005). Es wurden 7 Tage alte Keimlinge mit SG200 bzw. $\text{SG200}\Delta\text{pep1}$ infiziert und die Proben nach 24 h gemäß Protokoll vorbereitet (siehe Kap. 4.7.2). Die anschließenden TEM-Untersuchungen der SG200-Infektionen zeigten keine Akkumulation von ROS im pflanzlichen Gewebe auf, in infizierten Zellen konnte kein CeCl_3 -Präzipitat beobachtet werden. Jedoch wurden in Pflanzenzellen, die von $\text{SG200}\Delta\text{pep1}$ penetriert wurden, dunkle Flecken in der Peripherie von eindringenden Hyphen (Abb. 9 B), sowie zu späteren Zeitpunkten in der kompletten pflanzlichen Zelle beobachtet (Abb. 23). Dies ist ein Hinweis auf eine lokale apoplastische Anreicherung von ROS um das Penetrationsereignis herum, die im weiteren Verlauf zu massivem oxidativem Stress in der gesamten Zelle führen kann. Darüber hinaus konnte in infizierten Zellen das Reißen des Tonoplasten (Abb. 9 B) und die strukturelle Auflösung des Zellinneren (Abb. 24) beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die mit der *pep1*-Deletionsmutante infizierten Zellen als Abwehrreaktion programmierten Zelltod durchlaufen.

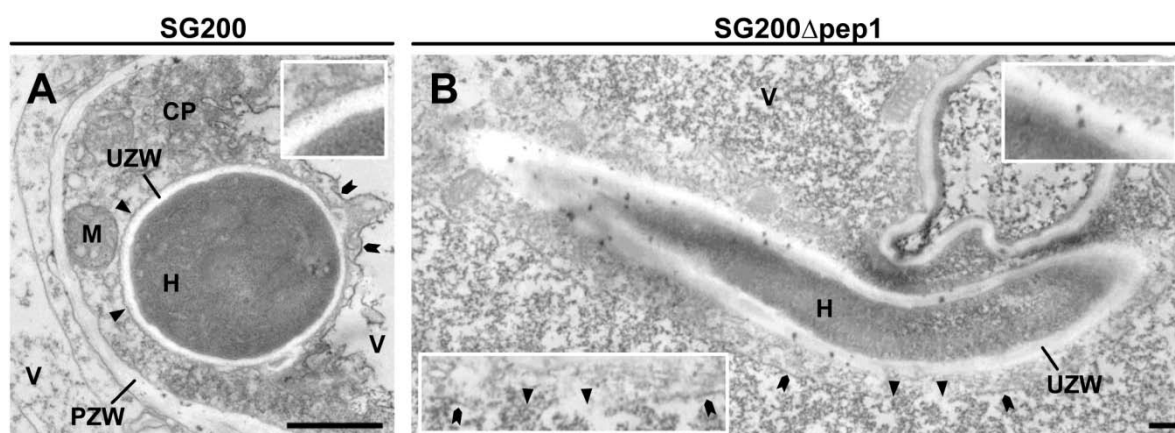


Abbildung 9: Penetrationsversuche der *pep1*-Deletionsmutante führen zu lokaler Anreicherung von H_2O_2

TEM-Analyse von infiziertem Maisgewebe, gefärbt mit $CeCl_3$, 30 hpi **A**: Penetrationsereignis mit SG200, die Hyphe (H) ist quergeschnitten. Die pflanzliche Plasmamembran (Pfeilspitzen) umschließt die Hyphe. Die Vergrößerung der biotrophen Interaktionszone zeigt keine Anzeichen von $CeCl_3$ -Färbung (Inset). V: Vakuole der Pflanzenzelle, C: Cytosol der Pflanzenzelle, UZW: *Ustilago maydis* Zellwand, PZW: pflanzliche Zellwand, M: Mitochondrium, Sparren: Tonoplast. **B**: Penetrationsereignis mit SG200 $\Delta pep1$, die Hyphe (H) ist längsgeschnitten. Eine starke $CeCl_3$ -Färbung in der Interaktionszone deutet auf eine Akkumulation von ROS als Antwort der Pflanze auf den Pathogenbefall hin (Pfeile). Der pflanzliche Tonoplast (Sparren) ist eingerissen (Pfeilspitzen), ein Hinweis auf ein frühes Stadium von programmiertem Zelltod (Inset links unten). Maßstabsbalken: 1 μm . Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Bernd Zechmann angefertigt.

Die beobachtete spezifische Anreicherung von ROS an Hyphen von SG200 $\Delta pep1$ warf die Frage auf, ob die Suppression dieser ROS-Antwort allein genügt, um die Biotrophie – zumindest teilweise – wiederherzustellen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Radikalfänger-Experiment (ROS scavenging) durchgeführt, wobei Ascorbat als Antioxidans genutzt wurde, um die Anreicherung von ROS in infiziertem Pflanzengewebe zu unterbinden (Asada, 1999). Wiederum wurden Maiskeimlinge mit SG200 $\Delta pep1$ RFP infiziert und ggf. 12 hpi mit Ascorbat behandelt. Makroskopisch zeigte sich eine Reduzierung der nekrotischen Blattbereiche in Ascorbat-behandelten Pflanzen verglichen mit der Wasserkontrolle (Abb. 26). Zur Quantifizierung der Besiedlung durch *U. maydis* wurde eine Anilinblaufärbung des infizierten Gewebes vorgenommen. Anschließend wurde die Länge der intrazellulär wachsenden Hyphen mikroskopisch ermittelt. Zur Bestimmung der pflanzlichen Abwehrreaktion wurden Keimlinge des Mais-Kultivars B73 PIN1_YFP infiziert, dessen Plasmamembran durch eine YFP-Fusion an den membranständigen Auxintransporter PIN1 fluoreszenzmarkiert ist. So konnte die Rate von Zellen, die eine erhöhte Autofluoreszenz als Stressreaktion auf ein Infektionsereignis aufweisen, ermittelt werden. Als Kontrolle dienten jeweils mit SG200 $\Delta pep1$ RFP infizierte

Pflanzen, die mit Wasser statt mit Ascorbat behandelt wurden. Bei diesem Experiment zeigte sich, dass die Behandlung mit dem Antioxidans tatsächlich sowohl die Besiedlungseffizienz durch *U. maydis* als auch die Abwehrreaktion der Pflanze beeinflusst. Während die Kontrollpflanzen Papillen an der Penetrationsstelle ausbildeten (Abb. 10 A), war in den ascorbatbehandelten Pflanzen deutlich weniger Fluoreszenzsignal in Blaukanal sichtbar. Den Hyphen gelang eine Penetration der Epidermis sowie Zell/Zell-Übergänge und Proliferationen (Abb. 10 B). In der Quantifizierung war ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Hyphenlänge von ca. 10 µm in Kontrollpflanzen auf ca. 60 µm in ascorbatbehandelten Pflanzen zu beobachten (Abb. 10 E). Bei der Betrachtung der Autofluoreszenz wurde deutlich, dass in der Wasserkontrolle nicht nur direkt penetrierte Epidermiszellen, sondern auch Nachbarzellen eine erhöhte Autofluoreszenz aufwiesen (Abb. 10 C). Im Gegensatz dazu wurden in ascorbatbehandelten Pflanzen Hyphen beobachtet, die Epidermiszellen penetrierten, ohne dass eine verstärkte Autofluoreszenz sichtbar war (Abb. 10 D). Die Rate von Epidermiszellen, die erhöhte Autofluoreszenz aufwiesen, sank durch die Ascorbatbehandlung von ca. 75 % auf ca. 30 % (Abb. 10 F). Die Behandlung infizierter Pflanzen mit einem Antioxidans führte also zu einem weiteren Vordringen der *pep1*-Deletionsmutante im Vergleich zur Wasserkontrolle.

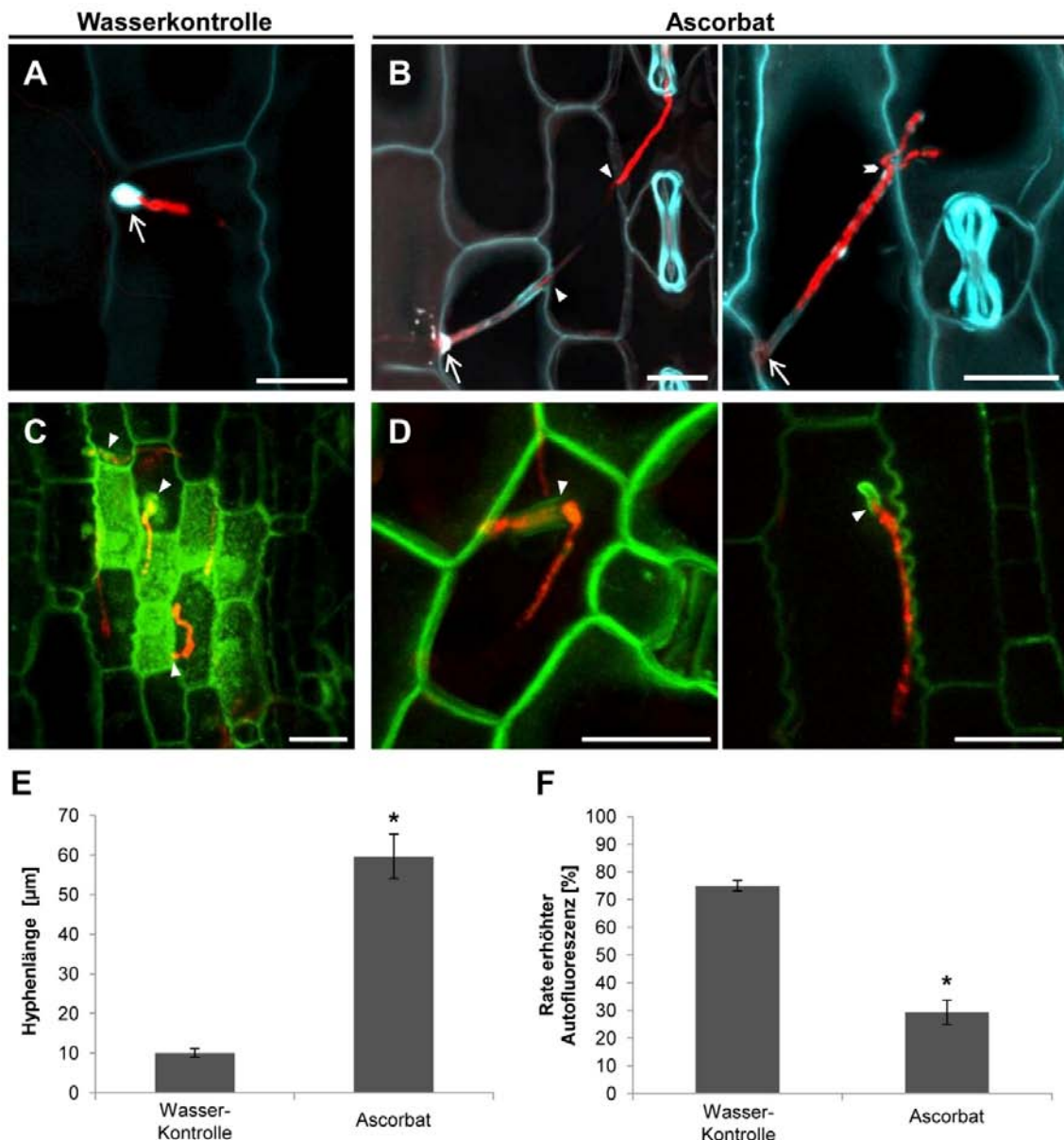


Abbildung 10: Der Radikalfänger Ascorbat vermindert die Penetrationsresistenz von Mais gegenüber der *pep1*-Deletionsmutante

A: Anilinblaufärbung eines Penetrationsversuchs von SG200Δpep1RFP, 24 hpi. Eine Papille wurde an der Penetrationsstelle ausgebildet (Pfeil). **B:** Anilinblaufärbung einer Infektion mit SG200Δpep1RFP auf Pflanzen, die mit 5 µM Ascorbat behandelt wurden. Pfeile markieren die Penetrationsstellen. Die penetrierenden Hyphen erreichen Zell-Zell-Übergänge (Pfeilspitzen) und können in einigen Fällen Proliferationen ausbilden (Sparren). **C:** SG200Δpep1RFP auf Maispflanzen, die PIN1-YFP exprimieren. Erhöhte Autofluoreszenz von penetrierten Zellen sowie benachbarten Zellen zeigt eine Abwehrreaktion der Pflanze an. **D:** Nach Behandlung mit 5 µM Ascorbat wurden Penetrationen von SG200Δpep1RFP in Epidermiszellen von PIN1-YFP-exprimierenden Maispflanzen beobachtet, ohne dass eine Abwehrreaktion durch erhöhte Autofluoreszenz sichtbar war. Alle Maßstabsbalken: 20 µm. **E:** Quantifizierung der intrazellulären Hyphenlänge von SG200Δpep1RFP auf Mais. Die Zugabe von 5 µM Ascorbat führt zu einem durchschnittlich 6-fachen Anstieg der intrazellulären Hyphenlänge im Vergleich zur Wasserkontrolle. **F:** Quantifizierung der Epidermiszellen von Maispflanzen des Kultivars B73 PIN1-YFP, die erhöhte Autofluoreszenz als Reaktion auf Penetrationsversuche von SG200Δpep1RFP aufweisen. Vergleich von wasserbehandelten mit ascorbatbehandelten Pflanzen. Die Behandlung mit 5 µM Ascorbat hat eine Reduktion der Abwehrsymptome um ca. 50 % zur Folge. Die gezeigten Daten repräsentieren drei biologische Replikate, P-Werte wurden durch einen ungepaarten *t*-Test bestimmt, die Fehlerbalken zeigen den SEM. * $P \leq 0,05$.

2.1.3 Pep1 inhibiert den PAMP-ausgelösten *oxidative burst*

Nachdem in den mikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, dass die *pep1*-Deletionsmutante von *U. maydis* eine erhöhte Immunantwort der Pflanze in Form eines apoplastischen *oxidative burst* aufweist und diese durch ein Antioxidans zumindest teilweise inhibiert werden konnte, sollte nun der Einfluss von Pep1 auf die pflanzliche Immunantwort untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Luminol-Assay mit Blattscheiben von Mais durchgeführt, um die Intensität des *oxidative burst* nach Behandlung mit einem Elicitor zu quantifizieren (Kap. 4.6.6). Als Elicitor diente Chitosan, eine deacetylierte Form des Polyaminosaccharids Chitin (Shahidi und Synowiecki, 1991), das von der Pflanze als PAMP erkannt wird und so eine Immunreaktion auslöst (Iriti und Faoro, 2009). In diesem Ansatz wurde der Effekt von heterolog in *E. coli* exprimiertem Pep1-Protein auf den PAMP-ausgelösten *oxidative burst* untersucht; als Kontrollen dienten hierbei heterolog in *E. coli* exprimiertes GFP und hitzeinaktiviertes Pep1-Protein. Es konnte gezeigt werden, dass der durch Chitosan ausgelöste *oxidative burst* ungefähr 20 min anhält und durch Zugabe von aktivem Pep1 nahezu vollständig inhibiert werden kann (Abb. 11 A). Die Zugabe von inaktiviertem Pep1 oder GFP hatten im Gegensatz dazu keinen Effekt auf die Immunantwort (Abb. 11 A). In der Quantifizierung wird deutlich, dass die Zugabe von 10 µM Pep1 eine Reduktion der gemessenen Peroxidkonzentration auf ca. 10% des Ausgangsniveaus zur Folge hat (Abb. 11 B). Durch Verwendung von hitzeinaktivierten SG200-Zellen als Elicitor konnte ein längeranhaltender *oxidative burst* ausgelöst werden, der ebenfalls durch Pep1 gehemmt wurde (Abb. 25).

Die hier beobachtete Inhibition des apoplastischen *oxidative burst* legt nahe, dass Pep1 als Inhibitor eines oder mehrerer Enzyme fungiert, die an der Produktion von H₂O₂ beteiligt sind. Hierfür kommen zwei Enzymklassen in Frage: membrangebundene NADPH-Oxidasen und apoplastische Peroxidasen (Bindschedler *et al.*, 2006; Bolwell, 1999; Gay *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2006). Zur Eingrenzung möglicher Pep1-Zielproteine innerhalb dieser Enzymklassen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem die Anreicherung von Peroxid durch eine Färbung mit Xylenolorange dargestellt werden kann (Gay *et al.*, 1999). Dazu wurden Blattscheiben von Mais in Pufferlösung schwimmend dem Elicitor Chitosan ausgesetzt und das von den Blattscheiben abgegebene H₂O₂ durch Xylenolorangefärbung des Puffers visualisiert (siehe Kap. 4.6.7). Zur spezifischen Hemmung H₂O₂-produzierender Enzymklassen kamen der Peroxidaseinhibitor Salicylhydroxamsäure (*Salicyl-hydroxamic acid*, SHAM) und Diphenyliodoniumchlorid (DPI) als Inhibitor für NADPH-Oxidasen zum Einsatz (Diethelm *et al.*, 1990; Morre, 2002). Weiterhin wurde heterolog in *E. coli* exprimiertes Pep1-Protein eingesetzt. Es zeigte sich

dabei, dass ein Anstieg der H_2O_2 -Konzentration im Puffer gemessen werden konnte, und dass die Zugabe von Pep1, nicht aber von Pep1_{IA} , eine Reduktion der Peroxidproduktion zur Folge hatte (Abb. 11 C). Auch die Zugabe der Inhibitoren SHAM und DPI führte in ähnlichem Maße zu einer verringerten Peroxidproduktion (Abb. 11 C).

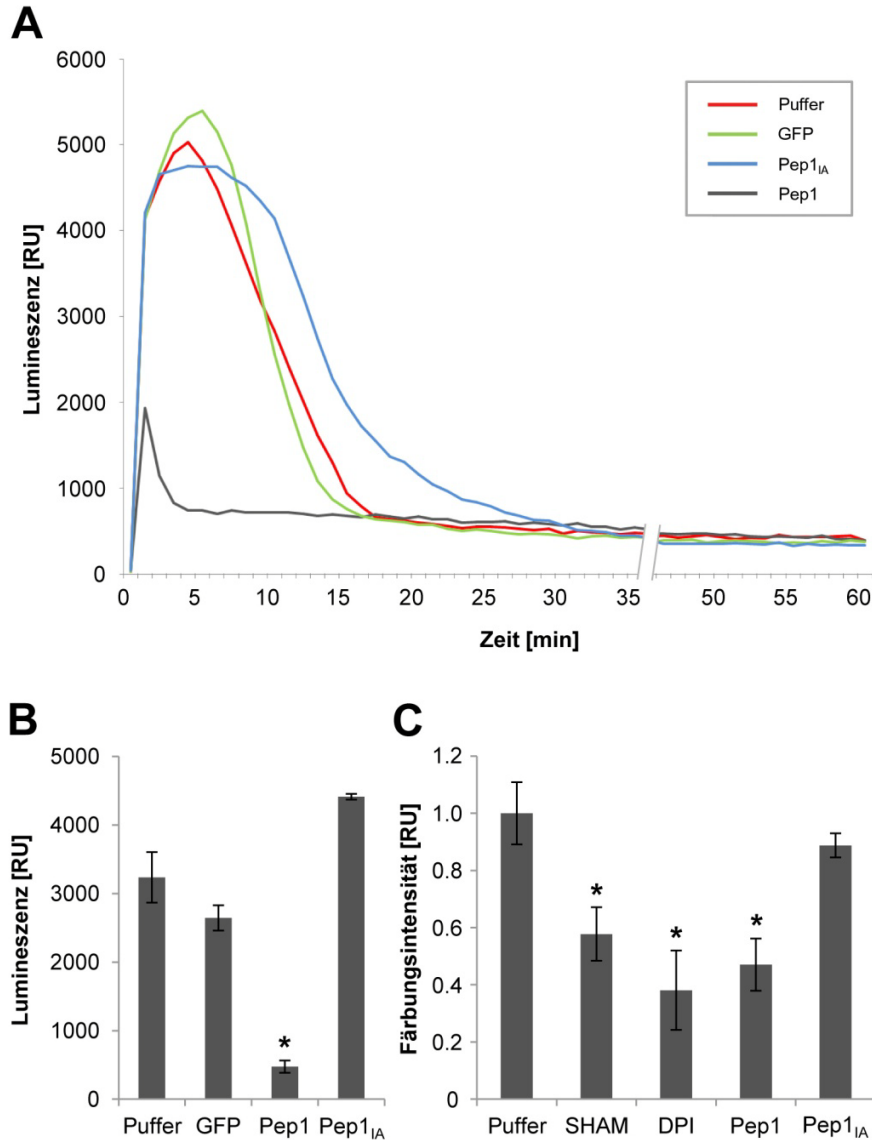


Abbildung 11: Inhibierung des elicitorvermittelten *oxidative burst* in Maisblättern durch Pep1 und spezifische Inhibitoren

A: Luminolbasierte Messung der H_2O_2 -Produktion in Mais-Blattscheiben. Der *oxidative burst* wurde durch die Addition von 2,5 mg/ml Chitosan eine Minute nach Start der Messung ausgelöst. Proteinkonzentrationen Pep1, Pep1_{IA} und GFP: 10 μM . **B:** Luminolbasierte Quantifizierung der elicitorvermittelten ROS-Produktion in Mais-Blattscheiben. Die Balken repräsentieren die integrierte Signalstärke von 6 unabhängigen Luminol-Proben über die ersten 5 min nach Elicitorzugabe. Die Zugabe von aktivem Pep1 führt zu einer signifikanten Abnahme der ROS-Produktion, verglichen mit den Kontrollen. **C:** Quantifizierung chitosaninduzierter H_2O_2 -Produktion in Maisblattscheiben durch Xylenolorangefärbung. Die Zugabe des Peroxidaseinhibitors SHAM (2 mM), des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI (5 μM), sowie aufgereinigten Pep1-Proteins (10 μM) führt zu einer signifikanten Reduktion der Peroxidproduktion. Die Zugabe von hitzeinaktiviertem Pep1 hat keinen derartigen Effekt. Die gezeigten Daten repräsentieren drei biologische Replikate. Die P-Werte wurden durch einen ungepaarten *t*-Test ermittelt, die Fehlerbalken zeigen den SEM. * $P \leq 0,05$.

Aus diesen Beobachtungen konnte demnach keine eindeutige Zuordnung des beobachteten *oxidative burst* zur Aktivität einer der beiden ROS-produzierenden Enzymklassen erfolgen. Um die Kandidaten für mögliche Pep1-Interaktionspartner dennoch eingrenzen zu können, wurden bereits vorhandene Microarraydaten hinzugezogen (Doehlemann *et al.*, 2009; Doehlemann *et al.*, 2008a). Daraus ging hervor, dass in Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante die Mais-Peroxidase12 (POX12) 106x induziert ist (Doehlemann *et al.*, 2009). Dieses Ergebnis konnte durch Christian Herrberger bestätigt werden, der eine Induktion von *pox12* in Mais nach Infektion mit der *Pep1*-Deletionsmutante durch qRT-PCR nachgewiesen hat (Herrberger, 2012). POX12 gehört der Gruppe der Klasse-III-Peroxidasen der pflanzlichen Häm-Peroxidase-Superfamilie an (NCBI: cd00693). Basierend auf dieser Beobachtung wurde der Fokus der folgenden Untersuchungen auf die Enzymklasse der Klasse-III-Peroxidasen gelegt.

2.1.4 Pep1 inhibiert eine pflanzliche Peroxidase

Um eine mögliche Hemmung der Aktivität pflanzlicher Peroxidasen durch *Pep1* zu untersuchen, wurde ein Peroxidase-Aktivitätstest mittels Diaminobenzidin (DAB) und der kommerziell erwerblichen Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) durchgeführt (siehe Kap. 4.6.8). Die HRP wurde aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den Klasse-III-Peroxidasen sowie ihrer guten Verfügbarkeit ausgewählt. In diesem Ansatz diente DAB in Anwesenheit von H_2O_2 als Substrat für die Peroxidase (vgl. Abb. 12 A) und wurde bei enzymatischer Aktivität derselben zu einem dunkelbraunen Präzipitat umgesetzt. Auch hier wurden hitzeinaktiviertes *Pep1*-Protein und GFP sowie BSA (bovines Serumalbumin) als Kontrollen genutzt. Es zeigte sich, dass die Zugabe von *Pep1* die Braunfärbung der Pufferlösung verringert, während sowohl die Zugabe von *Pep1_{IA}* als auch von GFP oder BSA die Färbung nicht beeinflussen (Abb. 12 A). In der Quantifizierung wird deutlich, dass die Aktivität der HRP durch *Pep1* sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 7,5 konzentrationsabhängig inhibiert werden kann, wobei die Zugabe von 10 μ M *Pep1* bei pH 7,5 eine nahezu vollständige Inhibition der enzymatischen Aktivität zur Folge hat (Abb. 12 B). Im Gegensatz dazu sind weder inaktiviertes *Pep1*-Protein noch die Kontrollproteine GFP und BSA dazu in der Lage, die enzymatische Aktivität der HRP zu beeinflussen.

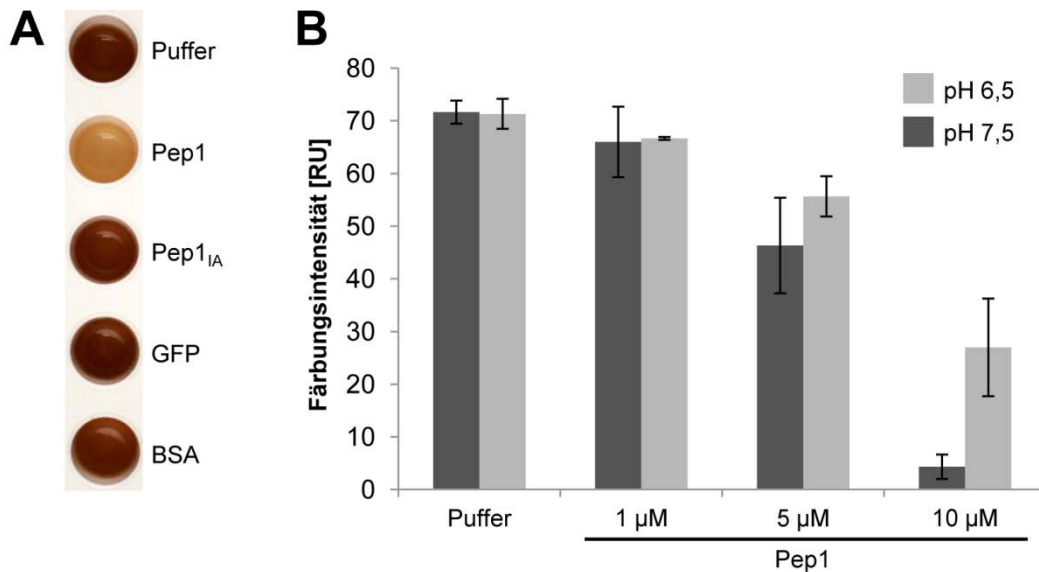


Abbildung 12: Pep1 inhibiert Peroxidaseaktivität

A: Darstellung der HRP-Aktivität durch eine *in vitro* DAB-Färbung. Eine dunkelbraune Färbung zeigt Peroxidaseaktivität an, da DAB durch die enzymatische Aktivität der HRP umgesetzt wird und ein dunkles Präzipitat bildet (Puffer). Das Hinzufügen von BSA, rekombinatem GFP oder hitzeinaktiviertem Pep1 (Pep1_{IA}) beeinflussen die Reaktion dabei nicht. Die Addition von aktivem Pep1 hingegen führt zu reduzierter DAB-Präzipitation; dies deutet auf eine verminderte Peroxidaseaktivität hin. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen betragen je 5 μM. **B:** Quantifizierung der DAB-basierten HRP-Aktivitätsmessung. Verschiedene Konzentrationen von rekombinatem Pep1-Protein wurden der Probenlösung zugesetzt, dabei wurden Puffer mit zwei verschiedenen pH-Werten eingesetzt. Pep1 war dabei in der Lage, die HRP-Aktivität in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 7,5 zu inhibieren. Eine nahezu vollständige Inhibition wurde bei pH 7,5 und einer Pep1-Konzentration von 10 μM erreicht.

Pep1 weist in der biotrophen Interaktion von *U. maydis* mit Mais, ebenso wie die sekretierte Peroxidase POX12, eine apoplastische Lokalisierung auf (Abb. 7) und ist zur Inhibition einer pflanzlichen Klasse-III-Peroxidase in der Lage. Daher wurde die These aufgestellt, dass Pep1 möglicherweise als Inhibitor von POX12 sowie weiterer sekretierter Klasse-III-Peroxidasen fungiert und so den apoplastischen *oxidative burst* unterdrückt. Diese Annahme setzt eine direkte Interaktion von Pep1 mit POX12 *in vivo* voraus.

2.1.5 Pep1 interagiert mit POX12 *in vivo*

Um die Interaktion von Pep1 mit POX12 *in vivo* zu untersuchen, wurde ein mikroskopischer Ansatz verfolgt, der auf der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (*bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) beruht. Hierbei werden die Nukleotidsequenzen zweier potentieller Interaktionspartner mit je einer Hälfte einer Nukleotidsequenz fusioniert, die für ein YFP-Chromophor kodiert. Diese Konstrukte werden nun mittels *Agrobacterium tumefaciens* - vermittelter Transformation in Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* exprimiert (Kap. 4.8.3) und die infizierten Blattbereiche im Anschluss mikroskopisch untersucht. Dabei geht man davon aus, dass nur bei direkter Interaktion der zu untersuchenden Proteine die räumliche Nähe der Interaktionspartner zueinander dazu führt, dass die beiden YFP-Fragmente sich aneinander anlagern und ein funktionelles Chromophor bilden (Waadt und Kudla, 2008). Eine mikroskopische Untersuchung zielt demnach darauf ab, YFP-Fluoreszenz in einem bestimmten Kompartiment der Pflanzenzellen nachzuweisen. Da dieser Ansatz einige Mängel aufweist, wie z.B. das Fehlen eines Expressionsnachweises sowie einer Negativkontrolle (Abb. 13 A), wurde er im Vorfeld der Untersuchungen modifiziert. Hierzu wurde der experimentelle Ansatz des geteilten YFP (*Split-YFP*) um zwei weitere Fluoreszenzmarker erweitert. Hierbei wird jedem potentiellen Interaktionspartner neben der beschriebenen YFP-Hälfte ein weiteres Chromophor (CFP bzw. mCherry) angehängt (siehe Kap. 4.3.7 für eine detaillierte Beschreibung). Die Folge davon ist, dass jeder der beiden potentiellen Interaktionspartner einzeln in *N. benthamiana* exprimiert und seine Expression sowie Lokalisation untersucht werden können (Abb. 13 B). Außerdem erlaubt dieser Ansatz eine Negativkontrolle, indem je ein Interaktionspartner mit einem Leervektor des korrelierenden BiFC-Konstrukts als Kontrolle cotransformiert wird. Dies führt zwar zur Expression und damit zum Fluoreszenznachweis von CFP und mCherry im gleichen Kompartiment, nicht aber zur Fluoreszenzkomplementation der beiden YFP-Hälften, da hier nun keine direkte räumliche Nähe der Interaktionspartner zueinander vorliegt (Abb. 13 B).

In diesem erweiterten BiFC-Ansatz (*enhanced BiFC*, eBiFC) wurde nun in Kooperation mit Morten Hillmer im Rahmen seiner Bachelorarbeit am MPI Marburg die Interaktion von Pep1 mit POX12 untersucht. Da davon auszugehen war, dass die Interaktion von Pep1 mit POX12 in der biotrophen Interaktion mit Mais im Apoplasten erfolgt, wurden dabei Pep1 und POX12 mit dem Sekretionssignal von Legumin B21 aus der Ackerbohne *Vicia faba* kloniert, so dass die Interaktionsstudien im Apoplasten der Tabak-Epidermiszellen stattfinden konnten.

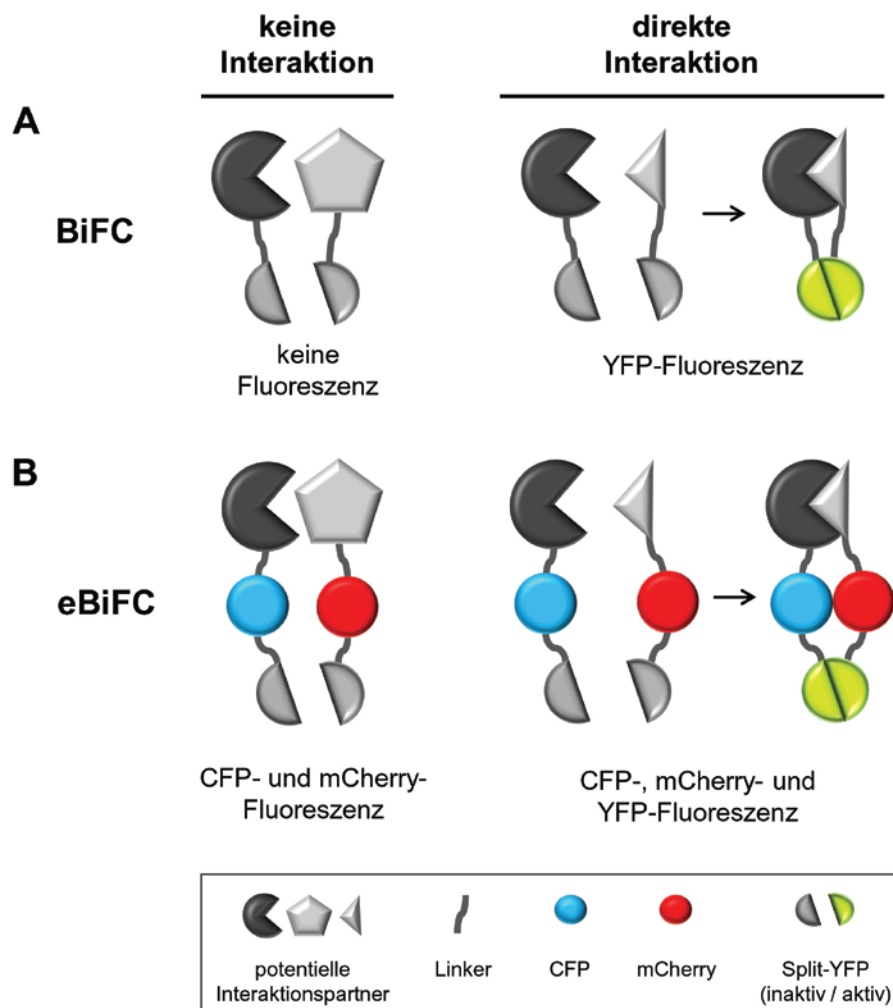


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Funktion von BiFC und eBiFC

A: BiFC, basierend auf einem geteilten YFP-Chromophor (*Split-YFP*). Im Falle einer direkten Interaktion zweier markierter Proteine kommen die YFP-Teile in räumliche Nähe zueinander und es erfolgt eine Fluoreszenzkomplementation, d.h. bei erfolgreicher Interaktion zweier markierter Proteine ist das Resultat eine YFP-Fluoreszenz (rechte Seite). Erfolgt keine Interaktion, so ist auch kein Fluoreszenzsignal sichtbar (linke Seite). **B:** Im Gegensatz zum einfachen BiFC stehen bei eBiFC auch bei fehlender direkter Interaktion der markierten Proteine die Fluoreszenzsignale von CFP und mCherry zur Verfügung und erlauben die Expressionskontrolle und Lokalisierung der Proteine (linke Seite). Bei einer Interaktion erfolgt zusätzlich dazu eine YFP-Fluoreszenz (rechte Seite).

In den Kontrollversuchen mit je einem Leervektor (pSPYCE_C bzw. pSPYNE_N) und einem der beiden potentiellen Interaktionspartner Pep1 (pSPYCE_Pep1 bzw. pSPYNE_Pep1) und POX12 (pSPYCE_POX12 bzw. pSPYNE_POX12) konnte zwar die Expression und apoplastische Lokalisierung beider exprimierter Konstrukte beobachtet werden, jedoch war keine Wiederherstellung der YFP-Fluoreszenz sichtbar (Abb. 14 A & 27 A). Das bedeutet, dass im Falle der untersuchten Interaktion von Pep1 mit POX12

höchstwahrscheinlich keine falsch-positive Fluoreszenzkomplementation vorliegt. Nun wurde die Interaktion von Pep1 und POX12 durch Coexpression der o. g. eBiFC-Vektoren in Tabak untersucht. Hierbei zeigte sich neben der apoplastischen Colokalisation der Fluoreszenzsignale von CFP und mCherry auch ein Fluoreszenzsignal im YFP-Kanal, das in seiner Lokalisierung den anderen beiden Signalen entsprach, es war also eine Fluoreszenzkomplementation durch die beiden YFP-Hälften erfolgt (Abb. 14 B & 27 B). Dies wurde als Hinweis auf eine tatsächlich erfolgende direkte Interaktion von Pep1 mit POX12 im pflanzlichen Apoplasten gewertet.

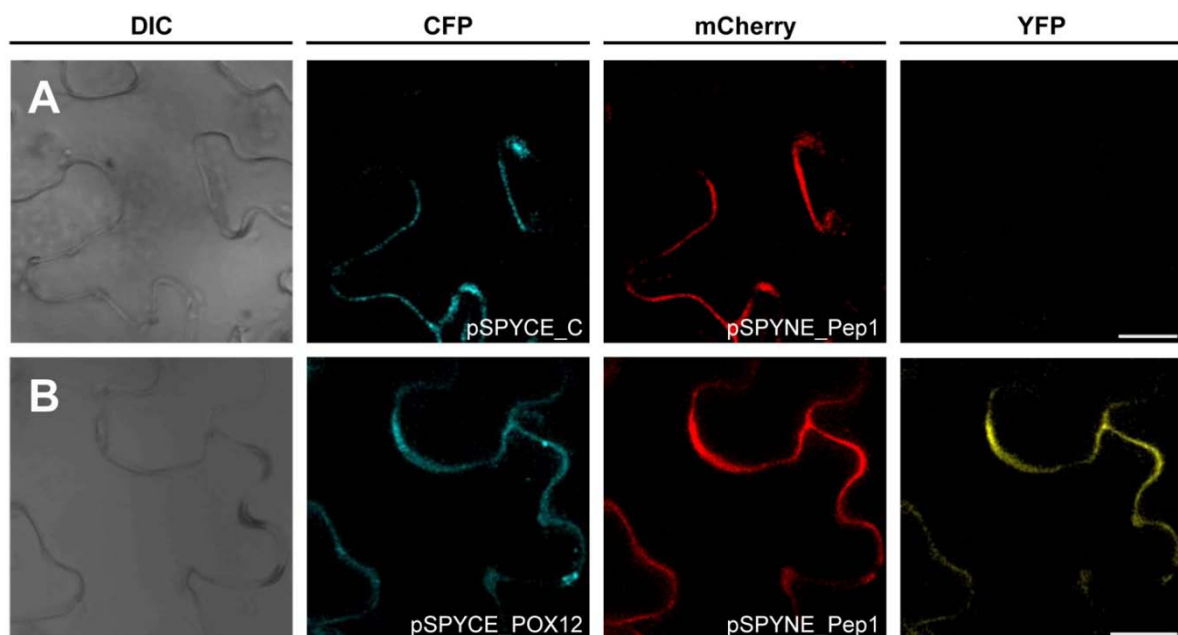


Abbildung 14: Nachweis der *in vivo* – Interaktion von Pep1 mit POX12 durch eBiFC

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* Epidermiszellen, die eBiFC-Konstrukte exprimieren. **A:** Eine Epidermiszelle, die pSPYCE_C als Kontrolle und pSPYNE_Pep1 coexprimiert. Der Blau- und der Rotkanal zeigen die Colokalisation der Signale im Apoplasten auf. Im YFP-Kanal kann keine Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden. **B:** Eine Epidermiszelle, die pSPYCE_POX12 und pSPYNE_Pep1 coexprimiert. Auch hier colokalisieren das CFP- und das mCherry-Signal im Apoplasten. Zusätzlich ist eine apoplastische YFP-Fluoreszenz sichtbar, die das gleiche Lokalisationsmuster wie das Rot- und Blausignal aufweist. Dies deutet auf eine Fluoreszenzkomplementation durch physikalische Interaktion von Pep1 mit POX12 hin. Alle Maßstäbsbalken: 25 µm. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Morten Hillmer durchgeführt.

Um die im eBiFC beobachtete Interaktion von Pep1 mit POX12 in einem weiteren *in vivo* -Experiment zu bestätigen, wurde darüber hinaus ein Hefe-2-Hybrid (Yeast-2-Hybrid, Y2H) – Ansatz verfolgt. Hierzu wurde Pep1 in den Y2H-*prey*-Vektor pGADT7 und POX12 in den Y2H-*bait*-Vektor pGBKT7 kloniert, die resultierenden Konstrukte in den Hefestamm AH109 transformiert und die Interaktion nach Standardprotokoll (siehe

Kap. 4.6.9) untersucht. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass eine Expression von Pep1 im *bait*-Vektor pGBKT7 zwar durchgeführt wurde, jedoch – vermutlich aufgrund von Selbstaktivierung – der resultierende Hefestamm alleine zum Wachstum auf Selektionsmedium in der Lage war (Daten nicht gezeigt) und daher hier keine Berücksichtigung findet. Durch die Untersuchung der Interaktion von Pep1 und POX12 im Hefe-2-Hybrid-Experiment konnte das Ergebnis der mikroskopischen Interaktionsstudien bestätigt werden: Auf Selektionsmedium zeigt das Wachstum der Pep1- und POX12-exprimierenden Hefetransformanten eine Interaktion der beiden Proteine an, während die Kontrollen mit Leervektoren kein Wachstum auf dem Selektionsmedium zeigten (Abb. 15). Um darüber hinaus die Frage zu beantworten, ob Pep1 an das aktive Zentrum der POX12 bindet, wurde in Kooperation mit Christian Herrberger die Nukleotidsequenz von POX12 so modifiziert, dass 3 Aminosäuren im aktiven Zentrum der Peroxidase (Lehtonen *et al.*, 2009) ausgetauscht wurden. Im Einzelnen wurden die Aminosäuren Arg74, His78 und His207 durch Alanine ersetzt (siehe Kap. 4.5.1). Das resultierende Konstrukt POX12_m wies in der Y2H-Studie keine verringerte Affinität zu Pep1 auf, das Koloniewachstum war vergleichbar mit der Interaktion von Pep1 mit der unmodifizierten POX12 (Abb. 15).

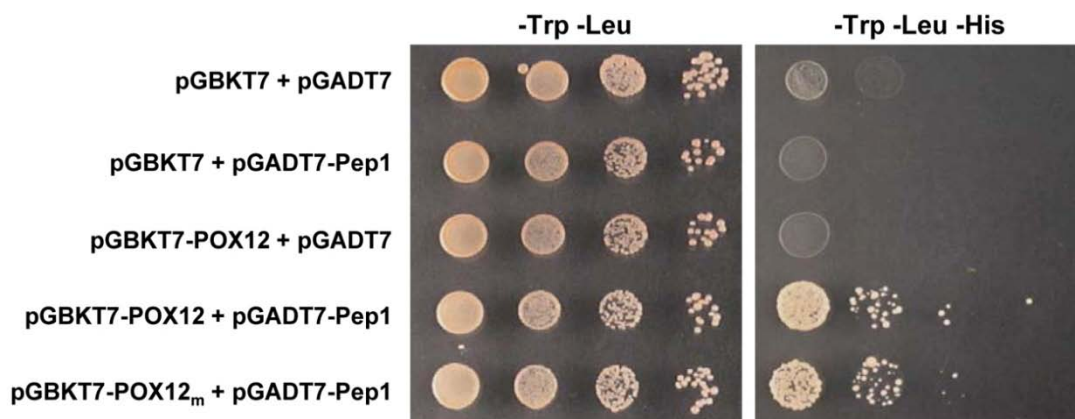


Abbildung 15: Bestätigung der Interaktion von Pep1 mit POX12 *in vivo* durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Ein Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment mit Pep1, POX12, dreifach punktmutierter POX12 (POX12_m), sowie den jeweiligen korrelierenden Leervektoren als Negativkontrollen. Weder die Paarung des Leervektors pGBKT7 mit dem Pep1-Konstrukt pGADT7_Pep1 noch die Paarung des Leervektors pGADT7 mit dem POX12-Konstrukt pGBKT7_POX12 führt zu Koloniewachstum auf dem Selektionsmedium (-Trp -Leu -His), während die Paarung von pGADT7_Pep1 mit pGBKT7_POX12 oder pGADT7_POX12_m zu Wachstum auf Selektionsmedium führt. Dies deutet auf eine physikalische Interaktion von Pep1 sowohl mit der aktiven Peroxidase POX12 als auch mit der inaktiven Form POX12_m hin. Die Mutation des aktiven Zentrums von POX12 erfolgte in Kooperation mit Christian Herrberger.

2.1.6 **Silencing von POX12 in Mais führt zur partiellen Wiederherstellung der Virulenz der *pep1*-Deletionsmutante**

Um die biologische Relevanz der Interaktion von Pep1 mit POX12 im Pathosystem *U. maydis* / Mais zu untersuchen, wurde in Kooperation mit Christian Herrberger die Genexpression von *pox12* in Mais durch *Silencing* unterdrückt. Hierzu wurde ein virusinduziertes Gen-*Silencing* (VIGS) - System genutzt, das auf dem Brom-Mosaik-Virus (BMV) basiert und das systemische *Silencing* in Mais auch während einer *U. maydis* - Infektion erlaubt (van der Linde *et al.*, 2011). Zu diesem Zweck wurden zwei Fragmente des für *pox12* kodierenden Bereichs in die RNA3 des BMV integriert und die drei für das Virus kodierenden RNAs (BMV-POX12si) zur Vermehrung des Virus in *N. benthamiana* inokuliert. Anschließend wurde aus den Blättern von *N. benthamiana* Virusextrakt hergestellt und dieser zur Inokulation von Maispflanzen (*Z. mays* cv. VA35) verwendet (siehe Kap. 4.8.1). Kontrollpflanzen wurden mit einem BMV-Stamm, der ein *Silencing*-Konstrukt für das Nichtpflanzengen *yfp* trägt (BMV-YFPsi), inokuliert.

Die Effizienz des *Silencings* wurde in Kooperation mit Christian Herrberger mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) ermittelt. Dabei zeigte sich in den BMX-POX12si-inokulierten Maispflanzen ein im Vergleich zu den Kontrollpflanzen um ca. 85 % reduziertes Transkriptionslevel von *pox12* (Abb. 16 C).

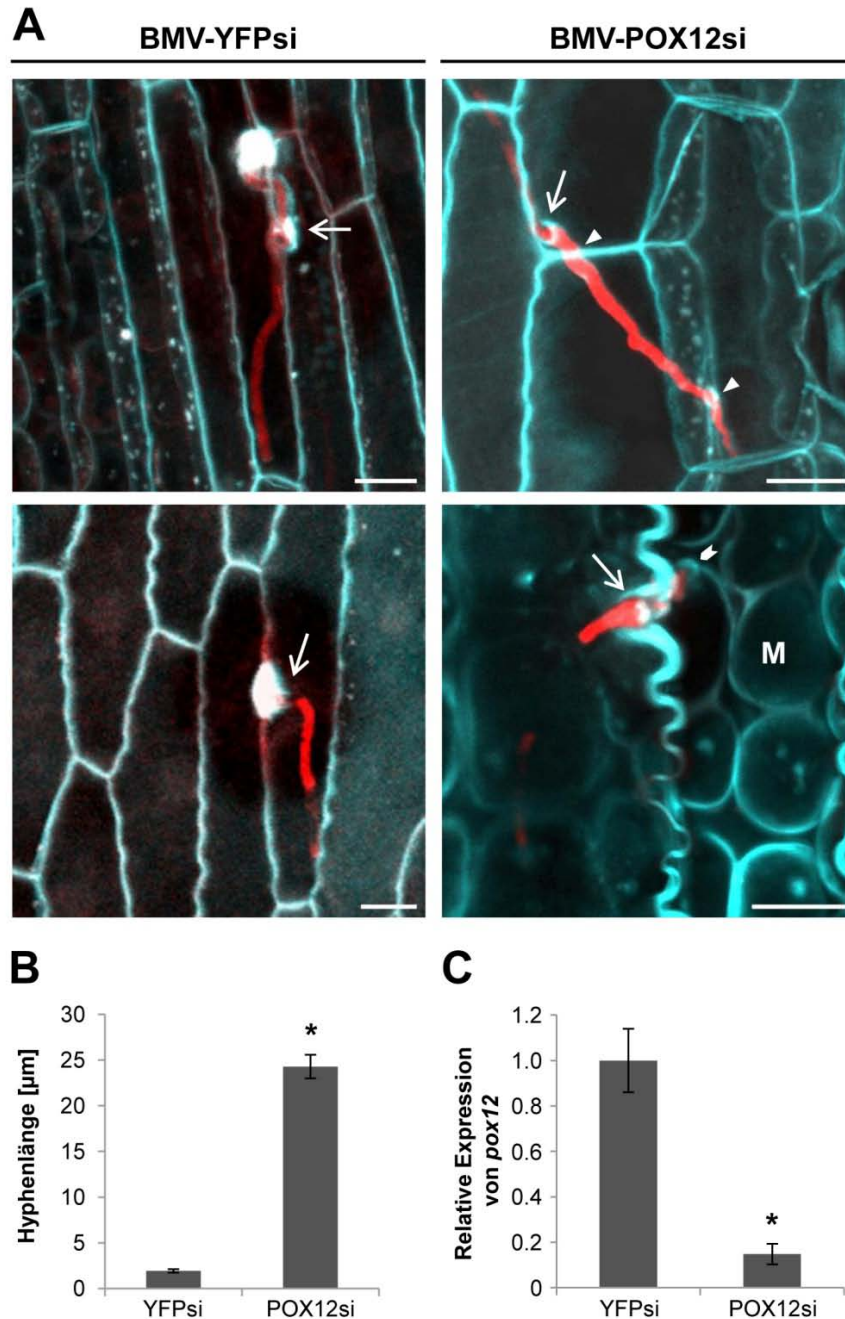


Abbildung 16: Silencing von *pox12* unterdrückt die Penetrationsresistenz von Mais gegenüber der *pep1*-Deletionsmutante

A: (linke Seite) Anilinblaufärbung von BMV-YFPsi-Kontrollpflanzen, infiziert mit SG200 Δ pep1RFP. Als Abwehrreaktion werden Papillen an den Penetrationsstellen gebildet (Pfeile) und die Infektion stoppt nach der Penetration. (rechte Seite) In der Infektion von BMV-POX12si-Pflanzen mit SG200 Δ pep1RFP sind weniger Abwehrreaktionen sichtbar. Dem Pilz gelangen die Penetration der Epidermiszellen (Pfeile), Zell/Zell-Übergänge (Pfeilspitzen) und das Erreichen der Mesophyllschicht (M, *Sparren*). Alle Maßstabsbalken: 10 μm . **B:** Quantifizierung der intrazellulären Hyphenlänge von SG200 Δ pep1RFP auf BMV-YFPsi- und BMV-POX12si-Pflanzen. Das Silencing von *pox12* führt zu einem ca. 10-fachen Anstieg der Hyphenlänge. **C:** Quantifizierung der *pox12*-Expression durch qRT-PCR mit Blattproben von 8 unabhängigen *pox12*-Silencing-Pflanzen (BMV-POX12si) und 7 Kontrollpflanzen (BMV-YFPsi) 48 h nach Infektion mit *U. maydis*. Die relative Expression von *pox12* in BMV-YFPsi wurde gemittelt und auf 1 gesetzt. Die Daten repräsentieren 3 biologische Replikate, P-Werte wurden durch einen ungepaarten *t*-Test ermittelt, die Fehlerbalken zeigen SEM, * $P \leq 0,05$. Die Durchführung des VIGS-Experimentes erfolgte in Kooperation mit Christian Herrberger.

Die so behandelten Maispflanzen wurden 48 h nach der Infektion mit *U. maydis* SG200 Δ pep1RFP mit Anilinblau gefärbt und konfokalmikroskopisch untersucht. Dabei verhielten sich die BMV-YFPsi-Kontrollpflanzen wie die zuvor untersuchten Pflanzen des Maiskultivars *Early Golden Bantam* und bildeten Papillen an den Penetrationsstellen (Abb. 16 A). Die durchschnittliche intrazelluläre Hyphenlänge betrug in diesen Pflanzen nur ca. 2 μ m (Abb. 16 B). Im Gegensatz hierzu konnten in BMV-YFPsi-Pflanzen in vielen Fällen lange intrazelluläre Hyphen beobachtet werden, die in einigen Fällen Zell/Zell-Übergänge vollzogen oder die das Mesophyll erreichten (Abb. 16 A). Die Quantifizierung der intrazellulären Hyphenlänge zeigte eine gegenüber den Kontrollpflanzen um den Faktor 12 erhöhte Hyphenlänge in den BMV-POX12si-Pflanzen auf (Abb. 16 B). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Aktivität von POX12 in der Interaktion mit *U. maydis* zur Resistenzvermittlung beiträgt und die Inhibition der Aktivität durch Pep1 essentiell für eine erfolgreiche Besiedelung des Wirtsgewebes ist.

2.2 Pep1 ist in verschiedenen Brandpilzarten funktionell konserviert

In einer vorhergehenden Arbeit wurde bereits nachgewiesen, dass die Funktion von Pep1 nicht auf die Interaktion von *U. maydis* mit Mais beschränkt ist, sondern dass auch die Brandpize *Ustilago hordei*, *Sporisorium scitamineum* und *Sporisorium reilianum* pep1-Orthologe aufweisen (Doehlemann *et al.*, 2009). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine vollständige Virulenzkomplementation der *U. maydis* pep1-Deletionsmutante durch das pep1-Gen aus *U. hordei* möglich ist. Dies warf die Frage auf, wie weit der Pep1-Wirkmechanismus innerhalb der Brandpilze konserviert ist. Da der Gerstenhartbrand *U. hordei* im Labor transformiert werden kann, wurde zur Bewertung der Relevanz der Konservierung von Pep1 der Fokus der Untersuchungen anfangs auf *U. hordei* gelegt.

2.2.1 Pep1 aus *U. maydis* hat eine Funktion in der Interaktion von *U. hordei* mit *Hordeum vulgare*

Zunächst wurde die pep1-Deletionsmutante von *U. hordei* mikroskopisch untersucht. Diese ist – analog zur Situation in *U. maydis* / Mais – nicht in der Lage, die Epidermis der Wirtspflanze ohne Auslösen einer Abwehrreaktion zu penetrieren und daher völlig

apathogen (Doehlemann *et al.*, 2009). Aufgrund des Umstandes, dass die Infektion von *U. hordei* auf Gerste bis zur Ausbildung der Infloreszenzen nach ca. 10-12 Wochen keinerlei makroskopischen Symptome zeigt, konnte eine symptomatische Betrachtung hier ausschließlich mikroskopisch erfolgen. Es sollte untersucht werden, ob *pep1* aus *U. maydis* in der Lage ist, die Virulenz der *pep1*-Deletionsmutante in *U. hordei* wiederherzustellen. Zu diesem Zweck wurden 12 Tage alte Gerstenpflanzen mit den kompatiblen Paarungspartnern 875-5 (Lee *et al.*, 1999) und 8A [ATCC 90511], sowie den Deletionsmutanten 875-5 Δ *pep1* und 8A Δ *pep1* (Doehlemann *et al.*, 2009) und den kompatiblen Deletionsmutanten, die das *pep1*-Gen aus *U. maydis* tragen (4875-5 Δ *pep1*-um*pep1* und 8A Δ *pep1*-um*pep1*, erhalten von Daniela Schwammbach), inokuliert. 48 h nach der Inokulation wurden Blattproben genommen und diese mit WGA-AF488 (*wheat germ agglutinin* konjugiert mit dem Chromophor Alexafluor488) und Propidiumiodid gefärbt (siehe 4.7.1). WGA-AF488 markiert die pilzliche Zellwand durch Bindung an das im Chitin enthaltene n-Acetyl-D-Glucosamin (Privat *et al.*, 1974; Tronchin *et al.*, 1981), Propidiumiodid bindet an die pflanzliche Zellwand (Estevez *et al.*, 2008; Fiers *et al.*, 2005). Es zeigte sich, dass der *U. hordei* - Wildtyp nach 48 h Epidermis und Mesophyll besiedelt hat und an Leitgefäßen entlangwächst (Abb. 17 A). Die *pep1*-Deletionsmutante ist nicht zur Besiedelung der Pflanze in der Lage (Abb. 17 B), jedoch erreichen die Komplementationsstämme eine Besiedelungsdichte, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist (Abb. 17 C).

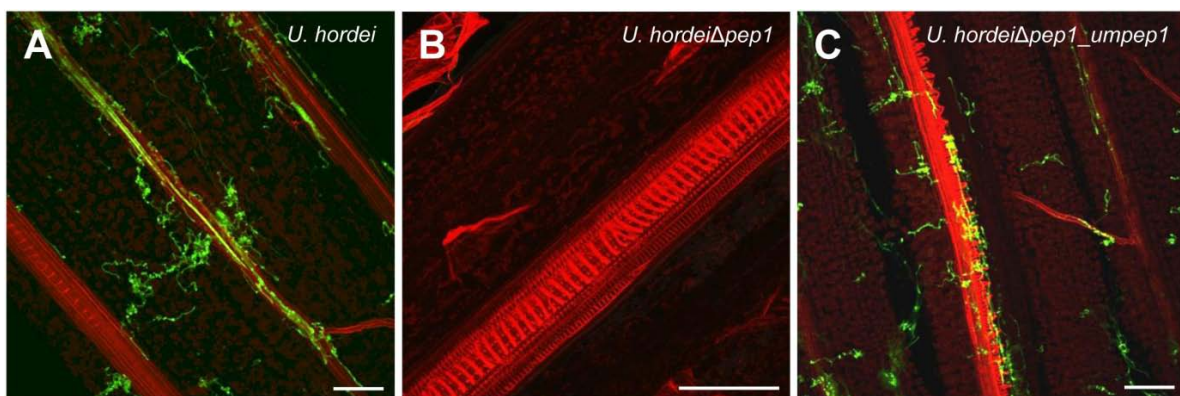


Abbildung 17: Pep1 aus *U. maydis* komplementiert den Phänotyp der *pep1*-Deletionsmutante in *U. hordei*

Infektionen von Gerste mit *U. hordei* 48 hpi. Der Rotkanal zeigt Propidiumiodidfärbung der Pflanzenzellen, der Grünkanal zeigt WGA-AF488-Färbung der Pilzzellwand. **A:** Der Wildtyp besiedelt Epidermis, Mesophyll und Leitgefäße der Wirtspflanze. **B:** Die *pep1*-Deletionsmutante erreicht keine Besiedelung des Pflanzengewebes. **C:** Die Komplementation der Deletionsmutante mit *Umpep1* resultiert in einer wildtypartigen Besiedlungsdichte. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Dies wurde als weiteres Indiz dafür gewertet, dass die Funktion von Pep1 über mehrere Pathosysteme hinweg konserviert sein könnte. Daher wurden die Untersuchungen auch auf andere Brandpilzspezies ausgedehnt.

2.2.2 Pep1-Orthologe liegen in *Ustilago*-Arten und den Gattungen *Melanopsichium* und *Exobasidium* vor

Um die Verbreitung des *pep1*-Gens innerhalb der Brandpilze zu untersuchen, wurden Wildtypisolate von Sporen der Arten *Ustilago avenae*, *Ustilago nuda* und *Ustilago tritici* (Sporenmateriale zur Verfügung gestellt von Dr. Karl-Heinz Müller, Getreidezüchtungs-forschung Darzau) in Kultur genommen. Weiterhin wurden Kulturen der Arten *Exobasidium pieridis-ovalifoliae*, *Exobasidium karstenii*, *Exobasidium vaccinii* und *Exobasidium yoshinagai* von Dr. Robert Bauer (Universität Tübingen), sowie gDNA der Art *Melanopsichium pennsylvanicum* von Dr. Marco Thines (Biodiversität und Klima Forschungszentrum, Frankfurt a. M.) zur Verfügung gestellt. Die Auswahl dieser Arten deckt einerseits ein breites Spektrum an Nutzpflanzenwirten innerhalb der Gattung *Ustilago* ab, andererseits schließt es den nächstverwandten Brand auf einem dikotyledonen Wirt (*M. pennsylvanicum* auf *Persicaria lapathifolia*) ein (Begerow *et al.*, 2006) und adressiert darüber hinaus die phylogenetisch eindeutig abgegrenzte Ordnung der Exobasidiales (Begerow *et al.*, 2006), die Ericaceae parasitieren. Von allen untersuchten Arten wurde gDNA extrahiert (Kap. 4.5.2) und die Artzugehörigkeit per PCR und Sequenzierung der ITS-Region (*internal transcribed spacer*) der 18S rDNA verifiziert (Primerpaar OCFH66/OCFH67). Im Anschluss wurde die gDNA per PCR mit dem Primerpaar Olex21/OCFH47 auf *pep1*-Orthologe hin untersucht. Dabei konnten für die Arten *U. avenae* und *U. nuda* vollständige offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) nachgewiesen werden (siehe Kap. 6.2). Darüber hinaus wurde in *U. tritici* ein partieller *pep1*-Ortholog identifiziert (siehe Kap. 6.2.5). Das Genom von *M. pennsylvanicum* war durch M. Thines vollständig sequenziert worden, der die *pep1*-Sequenz für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Auch hier konnte ein vollständiger ORF für *pep1* bestimmt werden (siehe Kap. 6.2.3). Für die Arten der Gattung *Exobasidium* gelang das im Rahmen dieser Arbeit nicht. Aus einem Sequenzvergleich der bisher identifizierten *pep1*-Orthologe konnte jedoch eine innerhalb der verschiedenen Brandpilzarten hochkonservierte Region im zentralen Bereich des *pep1*-Gens identifiziert werden (Abb. 18). Diese im Folgenden als konservierte Kernregion bezeichnete Sequenz enthält vier Cysteine (Doehlemann *et al.*, 2009), die

die Bildung zweier Disulfidbrücken vermitteln (Herrberger, 2012) und diente als Vorlage für die degenerierten Primerpaare OCFH57/OCFH59 bzw. OCFH58/OCFH60, die innerhalb dieser Region binden. PCR-Untersuchungen der *Exobasidium*-Proben mit diesen Primerpaaren zeigten ein Vorkommen der konservierten *pep1*-Kernregion in *E. vaccinii* auf. Für *E. yoshinagai* konnte eine partielle *pep1*-Sequenz identifiziert werden, die ein Startcodon mit anschließendem Signalpeptid enthält (siehe Kap. 6.2.7). Bis zum Abschluss der praktischen Arbeiten gelang es nicht, *pep1* in Volllänge in diesen Arten nachzuweisen, dies wird jedoch Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

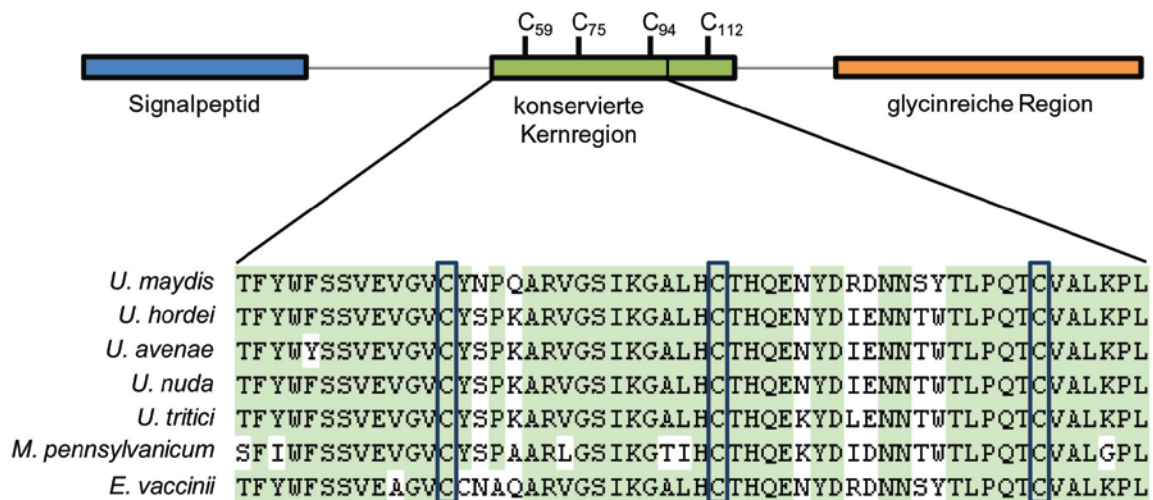


Abbildung 18: Sequenzvergleich von Pep1 aus verschiedenen Brandpilzarten

Sequenzvergleich der isolierten Pep1-Orthologe (ausgerichtet an AS 43 – 96 von UmPep1). Dieser Bereich der konservierten Kernregion von Pep1 weist eine sehr hohe Sequenzidentität auf. Grün markiert Aminosäuren, die in mehr als 5 der 7 Sequenzen identisch sind. Anm.: Da die reversen Primer OCFH59 und OCFH60 nicht am N-terminalen Ende sondern innerhalb der konservierten Kernregion binden, ist hier nur die Sequenz bis einschließlich AS 96 dargestellt, obwohl der homologe Bereich bis AS 115 reicht. Die Rahmen markieren die konservierten Cysteine C59, C75 und C94.

2.2.3 Verschiedene Pep1-Orthologe agieren als Peroxidaseinhibitoren

Um festzustellen, ob die Funktion von Pep1 innerhalb der untersuchten Brandpilzarten konserviert ist, wurden die verschiedenen Pep1-Orthologe heterolog in *E. coli* exprimiert und durch Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Proteine dem in Kapitel 2.1.4 beschriebenen DAB-Färbeexperiment unterzogen, um die inhibitorische Wirkung auf die Meerrettich-Peroxidase zu bestimmen. Hierbei wurde eine Peroxidaseaktivität von ca. 80 RU in der Kontrolle beobachtet (Abb. 19). Die Zugabe von je 6 µM der aufgereinigten Pep1-Orthologe führte zu einer

Reduktion der Aktivität auf 45 – 50 RU (Abb. 19), d. h. es zeigte sich ein vergleichbarer Effekt aller Pep1-Orthologe auf die Peroxidaseaktivität. Dies lässt den Schluss zu, dass Pep1 in den untersuchten Brandpilzarten als Peroxidaseinhibitor fungiert.

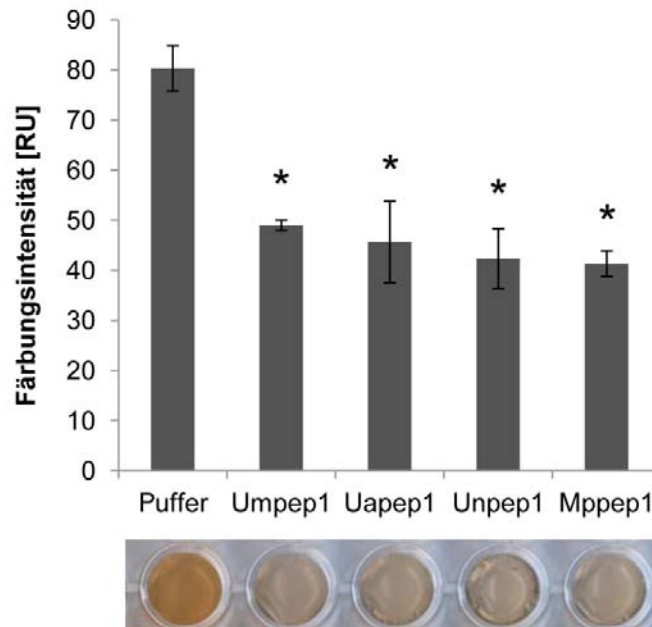


Abbildung 19: Pep1 aus verschiedenen Brandpilzarten inhibiert Peroxidaseaktivität

Darstellung der HRP-Aktivität durch eine *in vitro* DAB-Färbung. Im Vergleich zur Pufferkontrolle konnte durch die Zugabe von 6 μ M der jeweiligen Pep1-Enzyme Umpep1 (*U. maydis*), Uapep1 (*U. avenae*), Unpep1 (*U. nuda*) und Mppep1 (*M. pennsylvanicum*) eine signifikante Abnahme der Peroxidaseaktivität – angezeigt durch eine schwächere Braunfärbung der Flüssigkeit – erzielt werden. Die Daten repräsentieren 3 technische Replikate, P-Werte wurden durch einen ungepaarten *t*-Test ermittelt, die Fehlerbalken zeigen SEM, * $P \leq 0,05$.

2.2.4 Pep1 aus *U. maydis* inhibiert Peroxidaseaktivität in den Wirtspflanzen anderer Brandpilze

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die in Kapitel 2.2.3 beobachtete Peroxidaseinhibition durch Pep1 auch in dikotylen Wirtspflanzen eine biologische Relevanz hat. Zu diesem Zweck wurde apoplastische Flüssigkeit (AF) aus Wildtypisolaten der Wirtspflanzen *Persicaria lapathifolia* (als Wirt von *M. pennsylvanicum*) und *Rhododendron sp.* (als Wirt von *Exobasidium*) isoliert und in einem DAB-Färbexperiment auf Peroxidaseaktivität hin untersucht. Als Vergleich diente apoplastische Flüssigkeit aus Mais. Als Negativkontrolle diente hitzeinaktiviertes Pep1 (Pep1_{IA}), das keinen Effekt auf die Peroxidaseaktivität in AF aus Mais hat (Hemetsberger *et al.*, 2012). Alle untersuchten Pflanzenarten wiesen eine vergleichbare Peroxidaseaktivität auf, die DAB-Färbintensität lag dabei zwischen 35 und 50 RU (Abb.

20). Diese Aktivität konnte durch die Zugabe von je 10 μM heterolog in *E. coli* exprimiertem Pep1-Protein inhibiert werden, so dass die Intensität der Färbung auf 8 – 10 RU sank (Abb. 20).

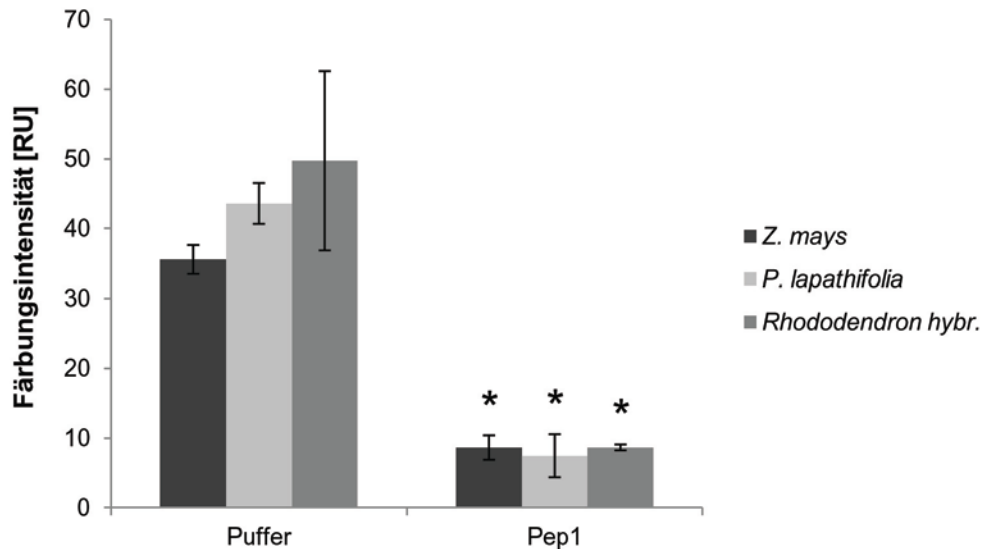


Abbildung 20: Pep1 aus *U. maydis* inhibiert Peroxidaseaktivität aus der apoplastischen Flüssigkeit von *Rhododendron* und *Persicaria*.

Darstellung der Peroxidaseaktivität durch *in vitro* DAB-Färbung. In AF von Mais, *Persicaria* und *Rhododendron* konnte eine vergleichbare Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden, die Färbungsintensität der DAB-Färbung lag zwischen ca. 35 RU bei Mais und ca. 50 RU bei *Rhododendron*. Durch die Addition von UmPep1 (10 μM) wurde diese Aktivität in jedem der getesteten AFs signifikant reduziert und lag in allen 3 Proben bei unter 10 RU. Die Daten repräsentieren 3 technische Replikate, P-Werte wurden durch einen ungepaarten *t*-Test ermittelt, die Fehlerbalken zeigen SEM, * $P \leq 0,05$.

2.2.5 Pep1 aus verschiedenen Brandpilzspezies kann die Virulenz der *pep1*-Deletionsmutante in Mais wiederherstellen

Abschließend sollte der Nachweis für eine funktionelle Komplementation von *pep1* aus *U. maydis* (*Umpep1*) durch die hier untersuchten *pep1*-Orthologe erbracht werden. Infolgedessen wurden die *pep1*-Orthologe aus *U. avenae* (*Uapep1*), *U. nuda* (*Unpep1*) und aus *M. pennsylvanicum* (*Mppep1*) jeweils durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus der *pep1*-Deletionsmutante SG200 Δ *pep1* integriert und die Integration durch einen Southern Blot bestätigt. Anschließend wurden 7 Tage alte Maiskeimlinge mit den resultierenden Stämmen SG200 Δ *pep1*-*Uapep1*, SG200 Δ *pep1*-*Unpep1* und SG200 Δ *pep1*-*Mppep1* infiziert. Als Kontrollen dienten Infektionen mit den Stämmen SG200, SG200 Δ *pep1* und SG200 Δ *pep1*-*Uhpep1* (Doehlemann *et al.*, 2009). Eine Symptombewertung 12 Tage nach Inokulation zeigte die Bildung von Tumoren an

Blättern und Stengeln in Infektionen mit jedem der drei Komplementationsstämme (Abb. 21 A). In einer Bonitur der Symptome zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm SG200 und den Komplementationsstämmen, die Gesamttumorrates lag jeweils bei ca. 90 % (Abb. 21 B). Daraus lässt sich schließen, dass die Funktion von Pep1 als Peroxidaseinhibitor innerhalb der Brandpilze hochkonserviert ist.

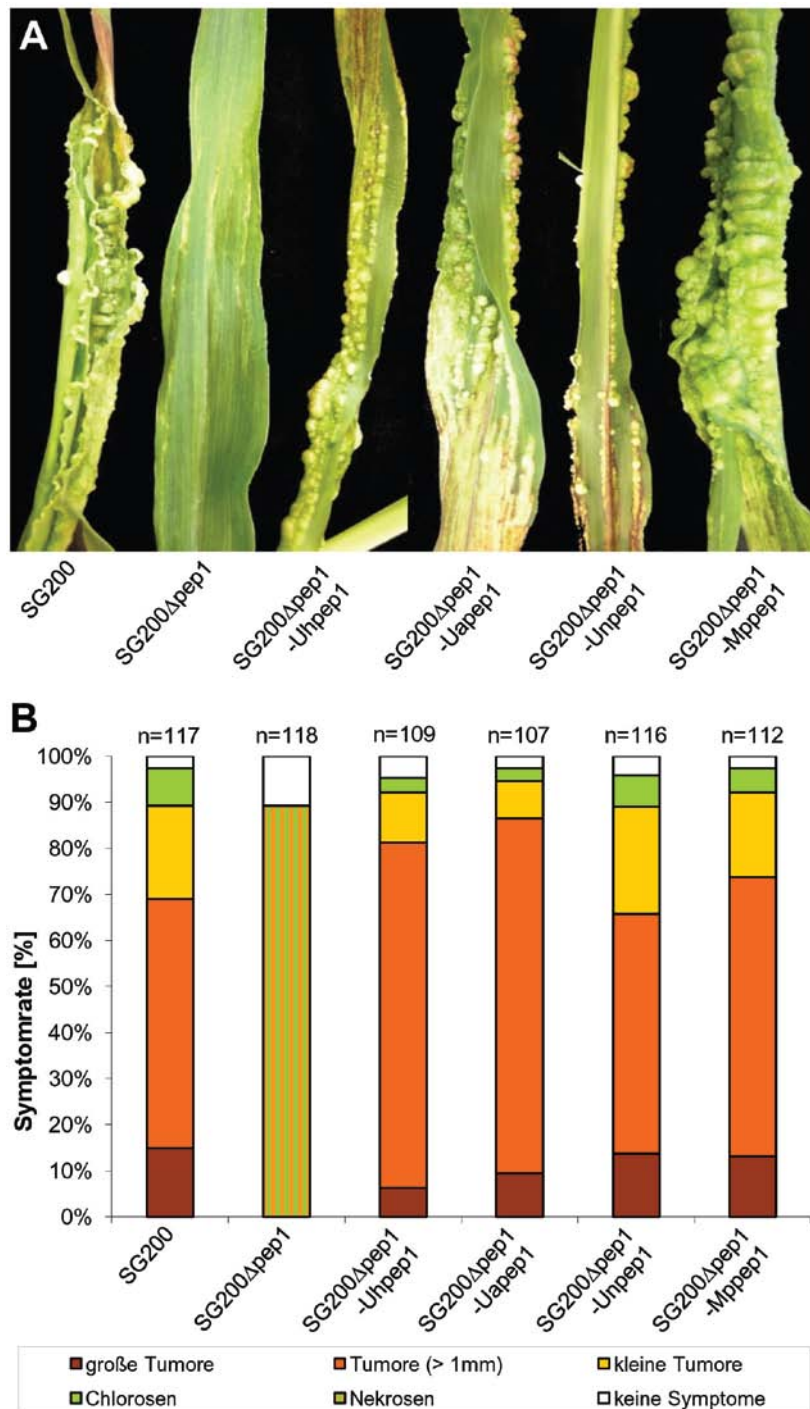


Abbildung 21: Pep1 aus verschiedenen Brandspezies stellt die Virulenz der *U. maydis pep1*-Deletionsmutante wieder her.

A: Makroskopischer Phänotyp von infizierten Maisblättern, 12dpi. Die Infektion mit SG200 führt zu einer Tumorbildung auf einem Großteil der Blattoberfläche, die Tumore erreichen teils deutlich über 1 mm Durchmesser. Die Infektion mit SG200 Δ pep1 bringt keinerlei Tumore hervor, lediglich nekrotische Blattbereiche sind sichtbar. Im Vergleich dazu weisen alle untersuchten Komplementationsstämme ein Tumorstadium auf, das mit dem einer SG200-Infektion vergleichbar ist. **B:** Virulenzanalyse (12 dpi) der Pep1-Komplementationsstämme, die *pep1*-Orthologe aus verschiedenen Brandspezies tragen, im Vergleich mit SG200 und SG200 Δ pep1. Die Tumorraten von SG200 liegt bei ca. 90 %, die Deletionsmutante löst Nekrosen bei ca. 90 % der Pflanzen aus. Alle hier untersuchten Komplementationsstämme wiesen Tumorraten auf dem Niveau von SG200 auf. Dies deutet auf eine vollständige Komplementation der Funktion von Pep1 durch die Orthologe aus den anderen untersuchten Brandpilzspezies hin.

3. Diskussion

Im Laufe der letzten Jahre wurde die wichtige Rolle von sekretierten Effektoren in der Interaktion von mikrobiellen Pathogenen mit ihren Wirtspflanzen deutlich (Hogenhout *et al.*, 2009; Jones und Dangl, 2006). Dabei wurden nicht nur Effektoren von bakteriellen Pathogenen untersucht (Dong *et al.*, 2011; Fujikawa *et al.*, 2006; Göhre und Robatzek, 2008; Kay *et al.*, 2007; Kelley *et al.*, 2010), sondern auch pilzliche Effektoren rückten zunehmend in den Fokus der Betrachtungen (Doehlemann *et al.*, 2011; Joosten *et al.*, 1994; Koeck *et al.*, 2011; Oliva *et al.*, 2010; Orbach *et al.*, 2000; Rivas und Thomas, 2005). Beiden gemein ist dabei eine mögliche Wirkung als Immunsuppressoren in der Wirtspflanze (de Jonge und Thomma, 2009; Stergiopoulos und de Wit, 2009; Xiang *et al.*, 2008), wobei die molekulare Wirkungsweise der Inhibition durch den Effektor bislang meist unaufgeklärt blieb. Für *U. maydis* wurden bislang die Effektoren Stp1 (Schipper, 2009), Pit2 (Doehlemann *et al.*, 2011), Pep1 (Doehlemann *et al.*, 2009) und die sekretierte Chorismatmutase Cmu1 (Djamei *et al.*, 2011) näher untersucht. Pep1 ist bisher das einzige Effektorprotein, das als essentiell für die Initiation der biotrophen Interaktion beschrieben wurde. In dieser Arbeit wurde der Interaktionspartner von Pep1 identifiziert und die Funktion von Pep1 in der Interaktion charakterisiert.

3.1 Pep1 ist ein apoplastischer Effektor

3.1.1 Pep1 lokalisiert im Apoplasten

Um die Funktion von Pep1 charakterisieren zu können, sollte zunächst der Wirkungsort des Proteins verifiziert werden. Zuvor war bereits gezeigt worden, dass Pep1 in der biotrophen Interaktionszone lokalisiert. Hierzu waren unter anderem Lokalisationsstudien mit mCherry-markiertem Pep1 in plasmolysiertem Pflanzengewebe durchgeführt worden; dabei zeigte sich eine apoplastische Lokalisierung von Pep1 (Doehlemann *et al.*, 2009). Bei dem verwendeten Konstrukt zur Fluoreszenzmarkierung handelte es sich um eine Fusion des Fluoreszenzmarkers mCherry an den C-Terminus von Pep1. Es bestand in diesem Zusammenhang die Gefahr einer Fehllokalisierung des Fluoreszenzsignals durch posttranslationale Modifikation und die Spaltung von Pep1 im Bereich des variablen C-Terminus. Dieser Verdacht wurde dadurch bestärkt, dass auf einem α HA - Western Blot mit sekretierten

Pep1-Fusionsproteinen von *U. maydis* nicht nur Pep1-mCherry-HA-Fusionsprotein in voller Länge, sondern auch Abbauprodukte in der Größe von ca. 32 kDa sichtbar wurden (Doehlemann *et al.*, 2009). Dies könnte der Größe von mCherry (ca. 27 kDa) plus HA-Epitop (ca. 2 kDa) und einem Fragment des Pep1-C-Terminus entsprechen. Weiterhin war bekannt, dass auch eine Trunkierung des variablen C-Terminus von Pep1 keine signifikante Abnahme der Virulenz von *U. maydis* zur Folge hat (Doehlemann *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass Pep1 in zwei Teile gespalten werden könnte und der C-Terminus im Apoplasten verbleibt, während der N-Terminus möglicherweise in die Pflanzenzelle aufgenommen wird und dort seine Funktion ausübt. Aufgrund dessen Grund sollte die apoplastische Lokalisierung des N-terminalen Teils von Pep1 bestätigt werden. Das hierzu erzeugte Konstrukt mCherry-Pep1 mit einer N-terminalen Fusion von mCherry an Pep1 wurde unter dem nativen Promoter in der *pep1*-Deletionsmutante SG200 Δ pep1 exprimiert und zeigte in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine Lokalisierung in der biotrophen Interaktionszone analog zu der des C-terminal markierten Pep1-Fusionsproteins Pep1-mCherry (Abb. 7). Diese Beobachtung widerlegt die Annahme der unterschiedlichen Lokalisierung von N- und C-Terminus von Pep1, so dass für die weiteren Untersuchungen von einer Wirkung des Effektors im Apoplasten ausgegangen wurde.

3.1.2 Pep1 unterdrückt die pflanzliche Abwehrreaktion

Von vielen sekretierten Effektoren weiß man, dass sie mit dem Immunsystem der Wirtspflanze interagieren (de Jonge und Thomma, 2009; Göhre und Robatzek, 2008; Guo *et al.*, 2009; Stergiopoulos und de Wit, 2009; Xiang *et al.*, 2008). Der genaue Wirkmechanismus dieser Effektoren ist jedoch oft noch nicht im Detail aufgeklärt.

Von Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante war bekannt, dass hier im Gegensatz zu Wildtypinfektionen keine Induktion von JA-induzierten Genen erfolgt (Doehlemann *et al.*, 2008a); dies ist jedoch essentiell für die Etablierung einer biotrophen Interaktion (Glazebrook, 2005). Stattdessen wird eine SA-basierte Abwehrreaktion ausgelöst, die zu programmiertem Zelltod und damit zum Scheitern der Infektion führt (Doehlemann *et al.*, 2009). Daraus lässt sich folgern, dass Pep1 ein entscheidender Faktor für die Etablierung einer kompatiblen Interaktion ist.

Zur Charakterisierung der Funktion von Pep1 wurde zunächst eine mikroskopische Untersuchung der biotrophen Interaktion von *U. maydis* mit Mais durchgeführt. Es zeigte sich, dass an Penetrationsstellen als initiale Abwehrreaktion eine Auflagerung

von Callose zur Zellwandverstärkung erfolgt, die durch den Wildtyp, nicht aber durch die *pep1*-Deletionsmutante unterdrückt wird (Abb. 8). Diese Calloseauflagerungen können eine eindringende Hyphe völlig umschließen und somit eine Papille bilden, die ein weiteres Eindringen des Pathogens verhindern soll. Zur mechanischen Stabilisierung des Zellwandmaterials bei der Papillenbildung muss eine Lignifizierung erfolgen (Bhuiyan *et al.*, 2009), die u.a. das Vorhandensein von ROS erfordert (Apel und Hirt, 2004; Hückelhoven, 2007; Ros Barceló, 1997). Da von Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante bereits bekannt war, dass diese eine lokale Anreicherung von ROS in infizierten Zellen auslöst, rückte die Produktion von ROS in der biotrophen Interaktionszone in den Fokus der Untersuchungen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde eine Anreicherung von H₂O₂ in Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante durch eine CeCl₃-Färbung nachgewiesen (Abb. 9). Weiterhin wurde in den TEM-Untersuchungen beobachtet, dass Pflanzenzellen in Infektionen mit der *pep1*-Deletionmutante zu einem späteren Zeitpunkt nicht nur lokal am Infektionsereignis Peroxid anreichern, sondern in der gesamten Zellperipherie starke CeCl₃-Signale auftreten (Abb. 23). In diesen Zellen wurde außerdem ein Einreißen der Tonoplastmembran beobachtet (Abb. 24). Das Reißen des Tonoplasten führt zur Freisetzung lytischer Enzyme aus der Vakuole in das Cytoplasma und in der Folge zur Degradation der Zelle (van Doorn und Woltering, 2005; van Doorn und Yoshimoto, 2010). Beide Phänomene sind charakteristische Anzeichen einer Abwehrreaktion in Form von programmiertem Zelltod (Coll *et al.*, 2011; Gechev und Hille, 2005; Gunawardena *et al.*, 2004; van Doorn, 2011; Wertman *et al.*, 2012). Diese Beobachtungen bestärkten die These, dass Pep1 an der Unterdrückung der Peroxid-anreicherung während der pflanzlichen Immunreaktion beteiligt sein könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Experimente mit dem Radikalfänger Ascorbat durchgeführt und dessen Einfluss auf die Interaktion von SG200Δ*pep1* mit Mais untersucht. Die Ascorbatbehandlung einer Infektion mit der *pep1*-Deletionsmutante führte zu verringerten Abwehrreaktionen der Pflanze und zu Penetrationen der Epidermis durch die SG200Δ*pep1* (Abb. 10). Das bedeutet, dass allein die Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies in infiziertem Pflanzengewebe die Immunreaktionen auf eine inkompatible Interaktion deutlich verringern kann, so dass ein weiteres Vordringen des Pathogens ermöglicht wird. Diese Beobachtung unterstreicht die Wichtigkeit der Unterdrückung des *oxidative burst* in der biotrophen Interaktion, jedoch ist die Rolle von Pep1 dadurch noch nicht eindeutig geklärt.

3.1.3 Pep1 inhibiert den apoplastischen *oxidative burst*

Die beobachtete Peroxidanreicherung in Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante und die partielle Komplementation des Pep1-Phänotyps durch einen Radikalfänger legten den Schluss nahe, dass Pep1 an der Unterdrückung des *oxidative burst* beteiligt ist. Durch ein Luminol-Experiment mit Mais-Blattscheiben konnte gezeigt werden, dass heterolog in *E. coli* exprimiertes Pep1-Protein in der Lage ist, einen elicitorvermittelten *oxidative burst* zu inhibieren (Abb. 11).

Die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies im elicitorvermittelten *oxidative burst* wurde bis vor kurzem ausschließlich der Aktivität membranständiger NADPH-Oxidasen zugeordnet (Bolwell, 1999; Bolwell *et al.*, 1995; Doke *et al.*, 1996). In jüngerer Zeit rückten jedoch Peroxidasen als eine zweite ROS-modifizierende Enzymklasse in den Fokus der Untersuchungen. Auch für Peroxidasen wurde inzwischen eine Rolle in der ROS-Produktion während des *oxidative burst* beschrieben (Baker und Orlandi, 1995; Bindschedler *et al.*, 2006; Bolwell *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2006). Um die Frage zu beantworten, welche der beiden Enzymklassen als mögliches Zielprotein für Pep1 in Frage kommt, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt: DPI, ein Inhibitor von NADPH-Oxidasen, und der Peroxidaseinhibitor SHAM (Davies und Edwards, 1989; Diethelm *et al.*, 1990; Morre, 2002). In der Xylenolorange-Färbung zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren: Sowohl DPI als auch SHAM verringerten die Konzentration an H₂O₂ deutlich, ebenso wie Pep1 (Abb. 11 C). Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass sowohl NADPH-Oxidasen als auch Peroxidasen einen Anteil an der gemessenen Peroxidanreicherung haben. So wurde vorgeschlagen, dass apoplastische Peroxidasen für die initiale Peroxidproduktion direkt bei Pathogenerkennung verantwortlich sind und diese ROS-Anreicherung die Expression und Aktivierung von NADPH-Oxidasen auslöst, die dann ihrerseits das ROS-Signal verstärken (Torres *et al.*, 2006). Eine solche positive Rückkopplung würde erklären, warum eine Hemmung jeder der beiden Enzymklassen gleichermaßen eine Reduktion der Peroxidkonzentration zur Folge hat. Weiterhin wird die Möglichkeit verschiedener pathogenspezifischer Abwehrreaktionen diskutiert, die sich auf unterschiedliche ROS-Quellen stützen, d.h. dass in Abhängigkeit von pathogenspezifischen Auslösern unterschiedliche *oxidative burst* – Ereignisse ausgelöst werden (Apel und Hirt, 2004; Bindschedler *et al.*, 2006; Grant und Loake, 2000). Eine weitere Möglichkeit besteht in einer nur wenig dokumentierten Unspezifität des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI, denn für DPI wurde neben der gut dokumentierten Hemmung von NADPH-Oxidasen auch eine Inhibition von Peroxidasen nachgewiesen (Frahry und Schopfer, 1998). Sollte dies im durchgeführten Experiment der Fall sein,

so wäre die gemessene Abnahme der Peroxidkonzentration auf eine Inhibition von Peroxidasen zurückzuführen. Anhand der gegenwärtigen Datenlage kann nicht abschließend beurteilt werden, ob NADPH-Oxidasen an dem hier gemessenen *oxidative burst* beteiligt sind oder nicht. In *A. thaliana* ist die Beteiligung der NADPH-Oxidasen *AtrbohD* und *AtrbohF* am *oxidative burst* beschrieben worden. Mutanten von *AtrbohD* und *AtrbohF* zeigen verringerte Abwehrreaktionen auf Infektionen mit einem avirulenten Stamm von *P. syringae* (Torres et al., 2002). Weiterhin wurde die transkriptionelle Induktion von *AtrbohD* nach Befall mit dem Pilz *Alternaria brassicicola* beobachtet (Pogány et al., 2009). Diese Beobachtungen sprechen für eine Beteiligung von NADPH-Oxidasen am *oxidative burst*, auch wenn vergleichbare Studien aus Mais nicht vorliegen. Geht man vom Modell einer Verstärkung des initialen Peroxidsignals durch NADPH-Oxidasen aus, so ist die Inhibition der Peroxidasen, nicht aber der NADPH-Oxidasen essentiell und hinreichend für die Etablierung einer kompatiblen Interaktion. Demnach könnte man annehmen, dass die Hemmung von Peroxidasen eine mögliche Funktion von Pep1 ist. Diese Annahme wird durch die beobachtete Induktion der POX12 aus Mais in Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante gestützt (Doehlemann et al., 2009) und diene als Arbeitshypothese für die folgenden Untersuchungen.

3.2 Pep1 ist ein Peroxidaseinhibitor

3.2.1 Pep1 inhibiert pflanzliche Peroxidaseaktivität

Um eine mögliche Funktion von Pep1 als Peroxidaseinhibitor zu untersuchen, wurde ein Peroxidase-Aktivitätstest auf der Basis von DAB mit Meerrettich-Peroxidase und H_2O_2 durchgeführt. Diese Methode erlaubt den spezifischen Nachweis von Peroxidaseaktivität (Graham und Karnovsky, 1966), so dass eine Inhibition der Reaktion durch Pep1 als eindeutiges Indiz für die Peroxidaseinhibition durch Pep1 gewertet werden kann. Die Peroxidase funktioniert bei diesem Experiment im Peroxidase-Zyklus und nutzt H_2O_2 und DAB als Substrate für die Reaktion (vgl. Abb 2). Auf diese Weise konnte eine Hemmung der Peroxidaseaktivität durch Pep1 beobachtet werden (Abb. 12).

Die Messungen der Peroxidaseaktivität mit DAB fanden bei neutralem bis leicht basischem pH statt (pH 6,5 und 7,5). Aus experimentellen Gründen konnte dabei ein pH von 6,5 nicht unterschritten werden, obwohl der zu erwartende pH im Apoplasten

niedriger ist (Pitann und Mühling, 2009). Dabei zeigte sich, dass sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 7,5 Pep1 als Peroxidaseinhibitor agiert, wobei bei pH 7,5 eine nahezu vollständige Inhibition bei einer Pep1-Konzentration von 10 μ M erreicht wird (Abb. 2 B). Im Gegensatz dazu liegt die Restaktivität der HRP bei pH 6,5 und 10 μ M Pep noch bei ca. einem Drittel des Ausgangsniveaus. Da eine transiente Alkalisierung des Apoplasten während des *oxidative burst* gut dokumentiert ist und die ROS-Produktion durch Peroxidasen mit Zunahme des pH ansteigt (Bindschedler *et al.*, 2001; Bolwell *et al.*, 2002; Bolwell *et al.*, 1995; Chen und Schopfer, 1999), ist es physiologisch sinnvoll, dass auch Pep1 seine optimale inhibitorische Wirkung bei leicht alkalischem pH erreicht. In einer DAB-Färbung von apoplastischer Flüssigkeit aus Mais konnte Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden (Hemetsberger *et al.*, 2012). Auch diese Peroxidaseaktivität in apoplastischer Flüssigkeit ist durch Zugabe von Pep1 hemmbar, wenn auch nicht vollständig (Hemetsberger *et al.*, 2012). Das Maisgenom codiert für ca. 150 Peroxidasen (Lüthje *et al.*, 2011), so dass es wahrscheinlich ist, dass die gemessene Peroxidaseaktivität durch verschiedene Peroxidasen entsteht. Das Vorkommen verschiedener Peroxidasen in apoplastischer Flüssigkeit aus Mais wurde bereits zuvor dokumentiert (Alvarez *et al.*, 2006). Daraus lässt sich folgern, dass neben POX12 noch weitere Peroxidasen im Apoplasten aktiv sein könnten. Diese könnten ebenfalls an der Produktion von ROS beteiligt und nicht bzw. nur teilweise durch Pep1 hemmbar sein, so dass im durchgeführten Versuch eine Restaktivität sichtbar ist. Obwohl der Anteil von POX12 an der gemessenen Peroxidaseaktivität in apoplastischer Flüssigkeit nicht bekannt ist, deutet die starke Induktion von POX12 in der Interaktion von Mais mit der *pep1*-Deletionsmutante (Doehle *et al.*, 2009) auf eine besondere Rolle dieses Proteins in der Abwehrreaktion hin. Demnach galt POX12 in den weiteren Untersuchungen als Hauptkandidat für ein Pep1-Zielprotein.

3.2.2 Pep1 bindet an die Peroxidase POX12 aus Mais

Zur Untersuchung einer möglichen direkten Interaktion von Pep1 mit Peroxidasen wurde von Christian Herrberger ein Far-Western Blot mit Meerrettich-Peroxidase und Pep1 durchgeführt, in dem eine Bindung von Pep1 an HRP nachgewiesen werden konnte (Hemetsberger *et al.*, 2012; Herrberger, 2012). HRP gehört, wie auch POX12, zu den Klasse-III-Häm-Peroxidasen, die teilweise eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zueinander aufweisen (Bolwell *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 2012). Daher kann die beobachtete Bindung von Pep1 an HRP *in vitro* als Hinweis auf eine Interaktion von Pep1 mit anderen Peroxidasen wie POX12 betrachtet werden.

Um die Hypothese der direkten Interaktion von Pep1 mit POX12 bestätigen zu können, sollte diese *in vivo* nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein erweitertes BiFC-Experiment (eBiFC) durchgeführt. Das Prinzip von BiFC beruht auf der Fluoreszenzkomplementation eines geteilten YFP-Chromophors bei räumlicher Annäherung der beiden Fragmente (Waadt und Kudla, 2008)(Abb. 13 A). Ein bekannter Nachteil von BiFC besteht darin, dass das geteilte YFP durch *self assembling* die Fluoreszenzkomplementation erreichen kann und so falschpositive Signale entstehen (Zhou *et al.*, 2011). Das hier vorgestellte eBiFC erlaubt zusätzliche visuelle Kontrollen und umgeht so diesen Nachteil (Abb. 13 B). Das Experiment war dabei so angelegt, dass die Interaktion im Apoplasten von Epidermiszellen von *N. benthamiana* durchgeführt wurden, um Bedingungen zu schaffen, die der Situation in der biotrophen Interaktionszone möglichst nahe kommen. So konnte durch eBiFC gezeigt werden, dass eine Interaktion von Pep1 mit der Peroxidase-12 aus Mais auch *in vivo* stattfindet (Abb. 14, 27). Zusätzlich wurde die Interaktion von Pep1 mit POX12 in einem Hefe-2-Hybrid-Experiment bestätigt (Abb. 15). Eine Mutation des aktiven Zentrums von POX12 hatte keine verringerte Bindungsaffinität zur Folge, so dass spekuliert werden kann, dass Pep1 nicht direkt am aktiven Zentrum bindet, sondern dieses entweder sterisch blockiert oder eine Konformationsänderung von POX12 bewirkt und so die Substratbindung oder -prozessierung verhindert. Zusammengefasst führten die bisherigen Beobachtungen zu der Annahme, dass Pep1 als Inhibitor von POX12 in der biotrophen Interaktion mit Mais fungiert.

3.2.3 Die Peroxidase-Inhibition durch Pep1 ist essentiell für die Etablierung der biotrophen Interaktion

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Peroxidasehemmung durch Pep1 auch in der biotrophen Interaktion von *U. maydis* mit Mais von biologischer Relevanz ist, wurde die Expression von *pox12* in Mais durch virusinduziertes Gen-Silencing (van der Linde *et al.*, 2011) unterdrückt. Auf diese Weise konnte eine partielle Komplementation des $\Delta pep1$ -Phänotyps erzielt werden (Abb. 16). Im Vergleich zu Kontrollpflanzen gelang der *pep1*-Deletionsmutante in den POX12si-Pflanzen ein Eindringen in Epidermiszellen ohne Auslösung sichtbarer Abwehrreaktionen sowie das Erreichen der Mesophyllschicht 2 dpi. Es kann hier jedoch nicht von einer vollständigen Wiederherstellung der Biotrophie ausgegangen werden. Da es sich bei der Genregulation durch VIGS um ein transientes Verfahren handelt (van der Linde *et al.*, 2011), konnte keine Bonitur als makroskopische Beurteilung der Symptome erfolgen.

Der transiente und zudem lokal stark begrenzte Charakter des durchgeführten VIGS könnte auch die Ursache für die unvollständige Komplementation des $\Delta pep1$ -Phänotyps sein. Daher wäre ein interessanter nächster Schritt in der Charakterisierung dieser Interaktion die Infektion von stabilen POX12-RNAi-Maislinien mit der *pep1*-Deletionsmutante, um untersuchen zu können, welche Stufe der Kompatibilität durch Inaktivierung des Pep1-Interaktionspartners erreicht werden kann. Außerdem sollte nicht unbeachtet bleiben, dass Klasse-III-Peroxidasen einen hohen Konservierungsgrad aufweisen (Bolwell *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 2012) und es daher nicht auszuschließen ist, dass das verwendete *Silencing*-Konstrukt nicht nur die Expression von POX12, sondern auch von weiteren Klasse-III-Peroxidasen beeinflusst hat. Eine *in silico* – Vorhersage der in diesem Versuchsansatz zu erwartenden siRNAs sagte das *Co-Silencing* dreier weiterer Peroxidasen voraus (Hemetsberger *et al.*, 2012). Deshalb könnte die beobachtete Komplementation des Phänotyps nicht nur auf das *Silencing* von POX12 alleine zurückzuführen sein. Die beobachtete Induktion von POX12 in $\Delta pep1$ -Infektionen spricht dennoch für POX12 als Haupt-Zielprotein von Pep1. Da bereits die Inhibition der Meerrettich-Peroxidase durch Pep1 beobachtet wurde, ist es nichtsdestoweniger wahrscheinlicher, dass Pep1 auch weitere Mais-Peroxidasen bindet und ihre Aktivität hemmt. Von der Annahme ausgehend, dass Pep1 mehrere Peroxidasen inhibieren kann, könnte die partielle Komplementation durch VIGS auch darauf zurückzuführen sein, dass das verwendete *Silencing*-Konstrukt nicht alle Peroxidasen, die durch Pep1 gehemmt werden, adressiert und darum die Restaktivität dieser Peroxidasen eine schwache Immunantwort vermittelt, die die vollständige Komplementation des Phänotyps verhindert. In Gersten wurde gezeigt, dass *Silencing* der NADPH-Oxidase HvrBOHF2 die Suszeptibilität gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* erhöht und die Abwehrreaktionen der Pflanze hemmt (Proels *et al.*, 2010). Interessanterweise wurde hier keine Inhibition des *oxidative burst* nach PAMP-Erkennung und keine verringerte Papillenbildung beobachtet, so dass man spekulieren könnte, dass auch hier Peroxidasen für diese frühen Abwehrreaktionen verantwortlich sind, während die Aktivität von NADPH-Oxidasen für spätere, nachgeschaltete Signalwege von Bedeutung ist.

3.2.4 Modell zur Funktion von Pep1 in der biotrophen Interaktion

Die funktionelle Charakterisierung von Pep1 durch mikroskopische und biochemische Methoden zeigte auf, dass Pep1 an Klasse-III-Peroxidasen bindet und deren enzymatische Aktivität inhibieren kann. Die transkriptionelle Induktion der POX12 in

Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante und die partielle Wiederherstellung der Virulenz durch VIGS von POX12 sprechen für die biologische Relevanz dieser Interaktion. Die durchgeführten Experimente lassen unter Berücksichtigung des aktuellen Kenntnisstandes auf dem Gebiet der Suppression der apoplastischen Immunität durch *U. maydis* die Formulierung des folgenden Modells zu (Abb. 22):

Beim Eindringen von *U. maydis* in eine Maisepidermiszelle erfolgt eine schnelle Erkennung des Pathogens durch PRRs anhand von PAMPs und DAMPs, die über eine MAP-Kinase-Kaskade eine SA-abhängige Abwehrreaktion induzieren. Es kommt zu einer Änderung der Permeabilität der Cytoplasmamembran und in der Folge zum Ionenaustausch zwischen Apoplast und Cytosol. Dies führt zu einer Aktivierung bereits im Apoplasten vorhandener Klasse-III-Peroxidasen, insbesondere von POX12. Diese Peroxidasen katalysieren eine Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies und initialisieren so einen apoplastischen *oxidative burst*. Der *oxidative burst* kann dabei möglicherweise durch die Aktivität von NADPH-Oxidasen verstärkt werden. Dieses ROS-Signal induziert in der Zelle die Transkription von POX12 und weiterer SA-abhängiger Gene und führt zur Aktivierung apoplastischer Proteasen. Darüber hinaus können die entstandenen ROS zur Lignifizierung von Zellwandmaterial im Rahmen der Papillenformation dienen. Sollte das fortschreitende Eindringen des Pathogens dadurch nicht verhindert werden können, so löst der hohe oxidative Stress einen programmierten Zelltod aus und die Infektion wird gestoppt. Um dies zu verhindern, bindet der sekretierte Effektor Pep1 im Apoplasten an Klasse-III-Peroxidasen wie POX12 und hemmt deren enzymatische Aktivität. So wird die initiale ROS-Produktion früh unterbunden und die Induktion abwehrrelevanter Genen verhindert. Dies geschieht in konzertierter Aktion mit einem Set sekretierter Effektoren, die weitere Ziele des pflanzlichen Immunsystems angreifen, wie dem apoplastischen Effektor Pit2, der die Aktivität sekretierter Proteasen hemmt (André Müller und Gunther Döhlemann, persönl. Mitteilung) oder der translozierten Chorismatmutase Cmu1, die die Synthese von SA verhindert (Djamei *et al.*, 2011). Darüber hinaus induziert *U. maydis* den JA-abhängigen Signalweg und die Expression von Kompatibilitätsfaktoren in der Wirtspflanze. So wird auch das pflanzliche Cystatin CC9 (*corn cystatin 9*) durch die biotrophe Interaktion induziert und vermittelt Suszeptibilität durch Hemmung apoplastischer Cysteinproteasen (van der Linde *et al.*, 2012a,b).

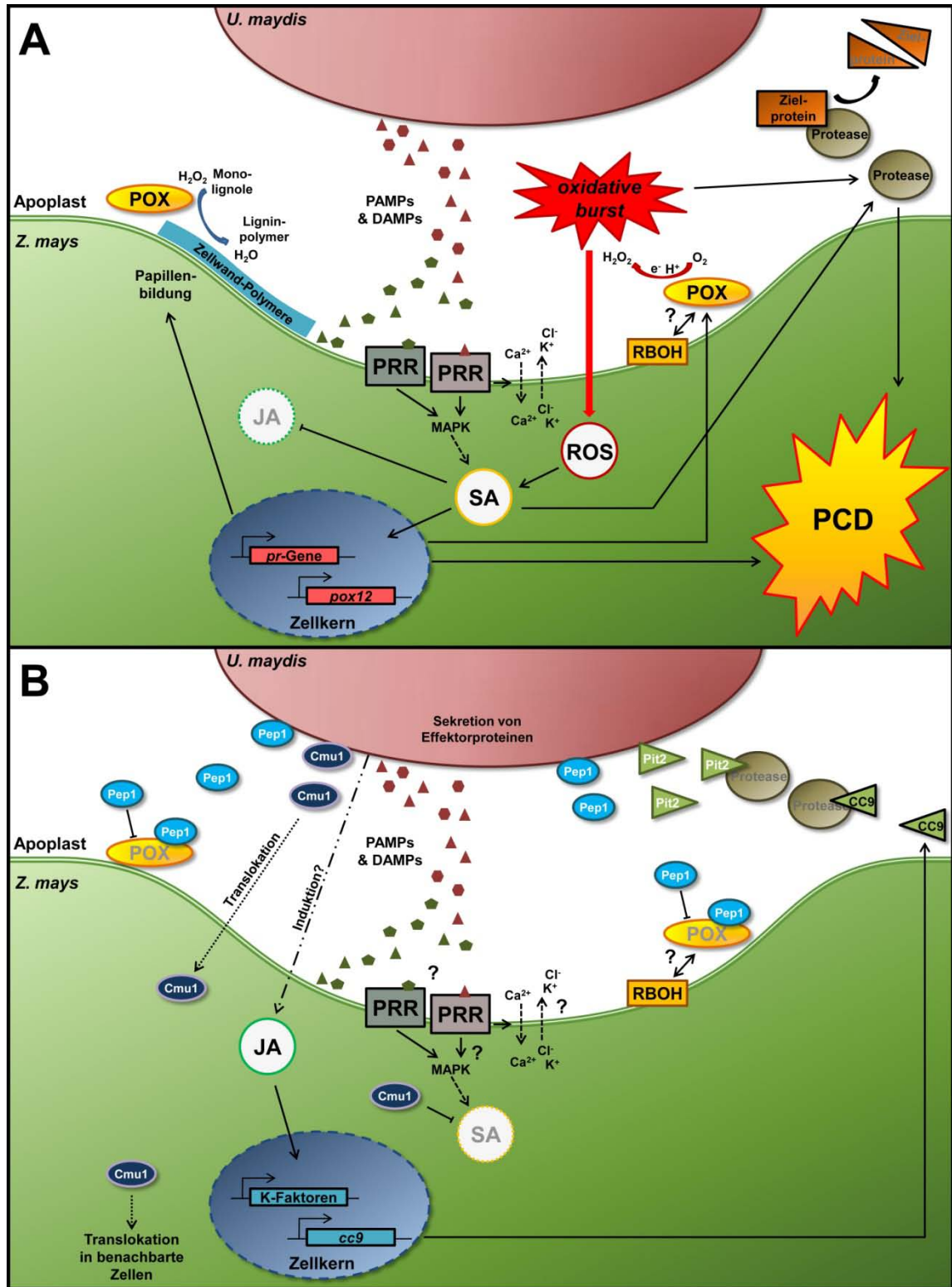


Abbildung 22: Modell zur Rolle von Pep1 in der biotrophen Interaktion von *U. maydis* mit Mais

A: Pflanzliche Abwehrreaktion auf Befall mit *U. maydis*. **B:** Etablierung der biotrophen Interaktion durch sekretierte Effektoren. Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen. PRR: *pattern recognition receptor*, POX: Peroxidase, RBOH: *respiratory burst oxidase homolog* (NADPH-Oxidase), pr: *pathogen resistance*, K-Faktoren: Kompatibilitätsfaktoren, MAPK: mitogenaktivierte Proteinkinase, ROS: *reactive oxygen species*, PCD: *programmed cell death*, PAMPs/DAMPs: *pathogen/damage associated molecular patterns*.

3.3 Pep1 ist innerhalb der Brandpilze konserviert

Ein in der Effektorbiologie gebräuchliches Modell ist die Gen-für-Gen-Interaktion von Effektoren durch Koevolution mit ihren Zielen im Wirtsorganismus. Demnach erreichen Effektoren einen hohen Grad an Diversifizierung und kommen so nur in einem oder wenigen Pathosystemen vor bzw. sind innerhalb verschiedener Pathosysteme hochvariabel (Ellis *et al.*, 2007; Flor, 1942; Jones und Dangl, 2006; Ma und Guttman, 2008). Insbesondere für Effektoren von Oomyceten wird ein hoher diversifizierender Selektionsdruck beschrieben (Soanes und Talbot, 2008). Ein Beispiel für diversifizierende Selektion ist der Effektor ATR13 aus *Hyaloperonospora parasitica*, der durch den Rezeptor RPP13 aus *A. thaliana* erkannt wird und so eine starke Abwehrreaktion auslöst (Rentel *et al.*, 2008). Sowohl ATR13 als auch das korrelierende R-Protein RPP13 weisen einen hohen Grad an Aminosäure-Polymorphismen auf (Allen *et al.*, 2004). Auch für die Effektoren EPIC1 und EPIC2 aus *P. infestans* und deren Zielprotein, die sekretierte Protease C14 aus der Kartoffelpflanze, konnte diversifizierende Selektion nachgewiesen werden (Kaschani *et al.*, 2010).

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz dazu auch ein Effektor existiert, der einen konservierten Mechanismus im Wirtsorganismus angreift und daher selbst ebenfalls hochkonserviert ist.

3.3.1 Pep1-Orthologe sind in verschiedenen Arten konserviert

Für Pep1 war bereits eine Konservierung der Funktion im verwandten Gerstenhartbrand *U. hordei* beschrieben worden (Doehlemann *et al.*, 2009). Dabei war bisher jedoch nur die Funktion von Pep1 aus *U. hordei* in *U. maydis* untersucht worden, nicht der umgekehrte Fall. Es zeigte sich, dass auch Pep1 aus *U. maydis* in der Lage ist, die Kompatibilität in der Interaktion von *U. hordei* mit Gerste zu vermitteln (Abb. 17). Dies ließ die Formulierung der Hypothese zu, dass es sich bei Pep1 um ein innerhalb der Brandpilze konserviertes Effektorprotein handelt. Dafür spricht auch, dass die Interaktionspartner, Klasse-III-Peroxidasen, ebenfalls eine Gruppe konservierter Proteine darstellen (Mathe *et al.*, 2010), und dass bereits die Meerrettich-Peroxidase durch Pep1 gehemmt werden konnte (Abb. 12). Davon ausgehend wurden nun weitere *Ustilago*-Spezies ausgewählt und auf ein *pep1*-Ortholog hin untersucht.

Die Auswahl der Spezies deckt dabei verschiedene landwirtschaftlich relevante Getreide als Wirtspflanzen ab (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer und Mais). Darüber hinaus wurden weitere Brandpilzspezies in die Untersuchungen einbezogen, die im Gegensatz zu *Ustilago* dikotyle Pflanzenwirte haben, um zu untersuchen, ob die Strategie der Suppression einer basalen Komponente des pflanzlichen Immunsystems über die Taxongrenze zwischen Ein- und Zweikeimblättrigen hinaus konserviert sein kann. Die Art *M. pennsylvanicum* wurde aufgrund ihrer phylogenetisch nahen Verwandtschaft zu *Ustilago* (Begerow *et al.*, 2006) und der Verfügbarkeit der Genomsequenz ausgewählt. Dieser Brandpilz parasitiert den Ampferknöterich *P. lapathifolia*. Arten der Gattung *Exobasidium* befallen Ericaceae und weisen einen deutlich geringeren Verwandtschaftsgrad zu *Ustilago* auf (Begerow *et al.*, 2006).

pep1-Orthologe konnten in allen getesteten *Ustilago*-Arten und in *M. pennsylvanicum* in voller Länge nachgewiesen werden. Dabei wurde auffällig, dass die Sequenz von *pep1* insbesondere in der Kernregion hochkonserviert ist (Abb. 18). Dies spricht für eine funktionelle Konservierung von Pep1 innerhalb der Brandpilze und für eine grundlegende Rolle von Pep1 als Suppressor der frühen pflanzlichen Immunantwort.

Durch ein DAB-Experiment mit Meerrettich-Peroxidase konnte eine inhibitorische Wirkung für Pep1 aus *U. avenae*, *U. nuda*, *U. tritici* und *M. pennsylvanicum* nachgewiesen werden, die mit der von *U. maydis* – Pep1 vergleichbar ist (Abb. 19). Pep1 ist demnach in verschiedenen Brandpilzarten als Peroxidaseinhibitor konserviert. Zur Bestätigung der biologischen Relevanz der beobachteten Peroxidaseinhibition wurde die *pep1*-Deletionsmutante von *U. maydis* mit den verschiedenen *pep1*-Orthologen transformiert und in der Interaktion mit Mais untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch alle getesteten Orthologe eine Komplementation der Virulenz auf ein wildtypartiges Niveau erreicht werden kann (Abb. 21). Dies bedeutet, dass Pep1 aus einem Dikotyledonen-Pathogen die gleiche biologische Funktion hat, wie im Modellsystem *Ustilago maydis* / Mais.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob Pep1 zur Inhibition weiterer Klasse-III-Peroxidasen in der Lage ist, die die jeweiligen Wirtspflanzen der getesteten Brandpilze zur apoplastischen Abwehr nutzen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde apoplastische Flüssigkeit aus Mais, Knöterich und Rhododendron präpariert und die Peroxidaseaktivität durch DAB-Färbung gemessen (Abb. 20). In der Tat wiesen die untersuchten Pflanzenproben eine vergleichbare Peroxidaseaktivität auf. Diese konnte durch Zugabe von Pep1 gehemmt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass in den untersuchten Arten apoplastische Klasse-III-Peroxidasen vorliegen, die durch Pep1 inhibiert werden können und die als Schlüsselkomponente der pflanzlichen Immunantwort offenbar evolutionär keine Form ausgebildet haben, die funktionell ist

und nicht durch Pep1 gehemmt wird. Dies wiederum legt nahe, dass Pep1 so an der Peroxidase ansetzt, dass der Verlust der Anfälligkeit gegen Pep1 den Verlust der Peroxidaseaktivität zur Folge hätte, so dass dieses Gen unter einem hohen stabilisierenden Selektionsdruck steht. Demnach hätten Mutationen der Peroxidasen große evolutionäre Nachteile zur Folge. Dies führt zu einer dauerhaften Anfälligkeit gegenüber dem konservierten Effektorprotein Pep1.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein pilzlicher Effektor innerhalb verschiedener Gattungen von Wirten und Pathogenen konserviert ist. Vergleichbare Untersuchungen an pathogenen Pilzen liegen zum aktuellen Zeitpunkt nicht vor, jedoch konnte in jüngster Zeit die funktionelle Konservierung von sekretierten Effektoren an Oomyceten nachgewiesen werden: Ein Ortholog des translozierten RXLR-Effektor HaRxL96 aus dem falschen Mehltau *Hyaloperonospora arabidopsidis* wurde im Soja-Pathogen *Phytohthora sojae* identifiziert (Anderson *et al.*, 2012). Beide Proteine, HaRxL96 und das Ortholog PsAvh163, erhöhen die Suszeptibilität für das jeweilige Pathogen. Überdies wurde gezeigt, dass beide Effektoren die Induktion von Abwehrgenen und die Akkumulation von Callose in Arabidopsispflanzen verhindern, obwohl eine SA-abhängige Abwehrreaktion induziert wurde (Anderson *et al.*, 2012). Die Autoren schließen daraus, dass konservierte Effektoren unterschiedlicher Pathogene die gleiche Funktion in verschiedenen Wirtspflanzen ausüben können. Diese Beobachtung deckt sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Studien an Pep1, so dass die Folgerung nahe liegt, dass die Überwindung des pflanzlichen Immunsystems durch mikrobielle Pathogene den Einsatz bestimmter funktionell konservierter Effektoren wie Pep1 voraussetzt, die konservierte basale Abwehrmechanismen der Wirtspflanze außer Kraft setzen und somit Suszeptibilität vermitteln. Kürzlich wurde beschrieben, dass *U. maydis* in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanze und der Art des umgebenden Gewebes organspezifische Effektoren sekretiert (Skibbe *et al.*, 2010). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde ein Konzept verschiedener Effektortypen vorgeschlagen: Einerseits unterdrücken Kerneffektoren die basalen Abwehrreaktionen der Pflanze, andererseits sind spezifische Effektoren für die Feinabstimmung der biotrophen Interaktion verantwortlich (Djamei und Kahmann, 2012). Pep1 ist dabei den Kerneffektoren zuzuordnen, die früh in der evolutionären Entwicklung der Wirt-Parasit-Interaktion entstanden und essentiell für die Etablierung der biotrophen Interaktion sind.

3.4 Ausblick

Im Rahmen der hier durchgeführten funktionellen Untersuchungen konnte die Funktion von Pep1 als Peroxidaseinhibitor dokumentiert werden. Bisher ist jedoch unklar, wo Pep1 am Zielprotein angreift, lediglich die direkte Interaktion beider Proteine konnte nachgewiesen werden. Zur Klärung dieser Frage könnten weitere Mutationen in POX12 eingeführt und die Interaktion mit Pep1 in einem Hefe-2-Hybrid-Experiment überprüft werden. Aufgrund des hohen Grades funktioneller Konservierung von Pep1 liegt dabei nahe, dass die Interaktion direkt mit der enzymatischen Aktivität der Peroxidase verknüpft sein könnte. Dies wäre leicht durch das bekannte DAB-Experiment mit HRP zu bestätigen.

Zur Untersuchung der Rolle von Pep1 als Vermittler basaler Suszeptibilität wurde bereits im Jahr 2011 im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jochen Kumlehn (IPK Gatersleben) die Herstellung stabiler Gerstenlinien initiiert, die Pep1 unter dem pathogeninduzierbaren Ger4-Promoter überexprimieren. Diese Pflanzen werden voraussichtlich ab Dezember 2012 zur Verfügung stehen. Zur Verifikation der Funktion eines pflanzlich exprimierten Pep1-Proteins sollen diese Pflanzen zunächst auf ihre Suszeptibilität gegenüber der *U. hordei pep1*-Deletionmutante getestet werden, bevor sie weiteren Pathogenen ausgesetzt werden. So könnte man die Abwehrreaktionen dieser Pflanzen auf Nichtwirts-Pathogene wie Roste und Mehltaue untersuchen. In Interaktionsstudien mit Gerste und dem Nichtwirts-Pathogen *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass sich die Abwehrreaktion von Gerste auf ein Nichtwirts-pathogen von der Abwehrreaktion auf die *pep1*-Deletionmutante unterscheidet (A. Hof & G. Döhlemann, persönl. Mitteilung). In diesem Zusammenhang könnten Untersuchungen an den *pep1*-Überexpressionspflanzen weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Etablierung einer biotrophen Interaktion und der Nichtwirtsresistenz liefern.

Weiterhin ist geplant, die Untersuchung der Verbreitung von *pep1*-Orthologen in anderen Pathogenen weiterzuverfolgen. Die Isolierung der Kernregion von *pep1* aus *Exobasidium vaccinii* und die funktionelle Konservierung von Pep1 in Mono- und Dikotyledonen gibt Grund zu der Annahme, dass noch weitere pathogene Pilze *pep1*-Orthologe aufweisen. Zur Identifikation dieser Orthologe sollen zunächst die

vollständigen Sequenzen von Pep1 aus *Exobasidium* isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden bereits entsprechende Methoden getestet.

Sollte die Identifikation von Pep1 in weiteren Pathosystemen gelingen, so wären auch diese Orthologe in den in dieser Arbeit etablierten Experimenten auf ihre funktionelle Konservierung hin zu untersuchen. Langfristig betrachtet ergäbe sich so die Möglichkeit, künftig Pep1 und ggf. weitere konservierte Effektoren zur phylogenetischen Klassifizierung von mikrobiellen Pathogenen zu nutzen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob nicht alle biotrophen Pathogene, die bei der Infektion der Wirtspflanze immer das pflanzliche Immunsystem und damit auch den *oxidative burst* überwinden müssen, analoge Strategien entwickelt haben, um ROS-generierende Enzyme zu inhibieren. Wenn man von einer strukturellen Konservierung der Peroxidasen ausgeht, liegt nahe, dass auch die korrelierten Inhibitoren eine konservierte Region aufweisen könnten, ähnlich der konservierten Kernregion von Pep1. Daher könnte man die Pep1-Kernregion zum *Screening* nach analogen Peroxidaseinhibitoren in bereits sequenzierten Pathogenen nutzen. Zudem ergibt sich aus dieser Annahme die Möglichkeit einer neuen Strategie für den Pflanzenschutz. Einerseits ist denkbar, einen spezifischen Inhibitor für Pep1-ähnliche Proteine zu konstruieren, der Pep1 bindet (oder spaltet), bevor es zur Etablierung der biotrophen Interaktion kommt. Eleganter wäre jedoch die Einführung eines spezifischen R-Gens in die Wirtspflanzen, das die Erkennung von Pep1 anhand der Kernregion vermittelt und eine Effektor-induzierte Abwehrreaktion auslöst.

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.* (1994) und Sambrook J *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 (Ipswich, MA, USA) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion[®] Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn), KOD Xtreme[™] Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt), Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) sowie 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 (Denver, USA), Eurogentec (Serain, Belgien) und Invitrogen (Darmstadt) bezogen.

4.1.4 Verwendete Kits

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen sowie zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Wizard[®] SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) verwendet. Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das QIAprep[®] 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. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach unten angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80 °C gelagert. In Expressionsstämmen, bei denen die Expression auf dem IPTG-Induktionssystem beruhte, wurde zwischen 1 und 5 % (w/v) Glucose zur Unterdrückung einer unerwünschten Aktivierung der T7-Polymerase zugefügt.

Antibiotikakonzentrationen

Ampicillin (Amp):	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cam):	34 µg/ml
Kanamycin (Kan):	50 µg/ml
Tetrazyklin (Tet):	2,5 µg/ml

dYT-Flüssigmedium	1,6 % (w/v) Trypton-Pepton
(Sambrook et al., 1989)	1,0 % (w/v) Hefeextrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
	in H ₂ O _{bid} .

4.2.2 Kultivierung von *A. tumefaciens*

A. tumefaciens - Stämme wurden in dYT-Medium bei 28 °C und 200 U/min kultiviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte in den unten angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80 °C gelagert.

Antibiotikakonzentrationen

Ampicillin (Amp):	100 µg/ml
Gentamycin (Gen):	40 µg/ml
Rifampicin (Rif):	50 µg/ml
Tetrazyklin (Tet):	2,5 µg/ml

4.2.3 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 (siehe unten), verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* - Kulturen erfolgte bei -80 °C unter Zugabe von 50 % NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen ÜN-Kultur.

Antibiotikakonzentrationen

Carboxin (Cbx):	2 µg/ml
Hygromycin (Hyg):	200 µg/ml
Phleomycin (Phleo):	5 µg/ml

YEPS-light	1 % (w/v) Hefeextrakt
(modifiziert nach	1 % (w/v) Pepton
Tsukuda et al., 1988)	1 % (w/v) Saccharose
	in H ₂ O _{bid.}

Potato-Dextrose-Agar (PD)	2,4 % (w/v) Potato-Dextrose Broth
	2 % (w/v) Bactoagar
	in H ₂ O _{bid.}

PD-Charcoal	wie PD, jedoch zusätzlich 1,0 % (w/v) Aktivkohlepulver
NSY-Glycerin	0,8 % (w/v) Nutrient Broth 0,1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Saccharose 69,6 % (v/v) Glycerin in H ₂ O _{bid.}

4.2.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde in einem Novaspec II Photometer (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 dieser Wert etwa 1×10^9 Bakterienzellen.

4.3 Verwendete Stämme, Oligonukleotide und Plasmide

4.3.1 *E. coli* – Stämme

In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* – Stämme und deren Verwendungszweck aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* - Stämme

Name	Genotyp	Verwendung	Referenz/Bezug
K-12 Top10	[F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacO</i> 74 <i>recA</i> 1 <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA</i> 1 <i>nupG</i>]	Plasmidamplifikation/ Klonierung	Grant <i>et al.</i> , 1990 / Invitrogen (Karlsruhe)

K-12 DH5 α	[F- Φ 80d lacZ Δ M15 Δ (lacZYAargF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ -thi-I gyrA96 relA1]	Plasmidamplifikation/ Klonierung	Hanahan, 1983 / Gibco / BRL (Eggenstein)
BL21 Rosetta- gami (DE3)pLysS	[Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+ lacIq pro] gor522::Tn10 trxB pRARE (CamR, KanR, StrR, TetR)]	Proteinexpression	Novagen / Merck (Darmstadt)

4.3.2 *A. tumefaciens* – Stämme

Für transiente Expression von Proteinen in *N. benthamina* wurde der *A. tumefaciens* - Stamm GV3101 verwendet (Koncz und Schell, 1986). Dieser besitzt eine chromosomale Rif-Resistenz. Außerdem ist in dem Stamm das Ti-Plasmid pMP90 für die Expression der für den DNA-Transfer nötigen vir-Gene, jedoch mit einer ansonsten unfunktionellen T-DNA-Region, enthalten. Das Ti-Plasmid vermittelt Gen-Resistenz. Außerdem enthält der verwendete Stamm eine auf dem Ti-Helferplasmid lokalisierte Tet-Resistenz. Dieses Plasmid vermittelt *in trans* die Replikation der Plasmide in *A. tumefaciens*. Bei den weiterhin zur Transformation von *A. tumefaciens* verwendeten Plasmiden handelt es sich um pGreenII-Derivate (vgl. 4.3.7), die Kan-Resistenz vermitteln.

4.3.3 *U. maydis* - Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* - Ausgangsstämme (Tabelle 2) sowie die in dieser Arbeit hergestellten Stämme (Tabelle 3) beschrieben. Für die Integration von Genen in den *ip*-Lokus wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ip_R*) tragen (Broomfield und Hargreaves, 1992). Diese Plasmide wurden über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven, *ip*-Allel (*ip_S*) 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 4.3.7 beschrieben.

Tabelle 2: Verwendete *U. maydis* - Ausgangsstämme

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	Phleo	Kämper <i>et al.</i> , 2006
SG200rfp	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 ipr[Potef-rfp]ips</i>	Phleo, Cbx	Fuchs <i>et al.</i> , 2006
SG200 Δ pep1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>Δpep1::hph</i>	Phleo, Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200 Δ pep1rfp	<i>a1 mfa2 bW2 bE1</i> <i>Δpep1::hph</i> <i>ipr[Potef-rfp]ips</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200pep1:gfpR	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 um-pep1-egfp::hph ipr[Potef-rfp]ips</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
SG200 Δ pep1-Uhpep1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>Δpep1::hph</i> <i>ipr[Pwt-uhpep1]ips</i>	Phleo, Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009

Tabelle 3: In dieser Arbeit generierte *U. maydis* – Stämme

Name	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
SG200 Δ pep1-mCherry:pep1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum-pep1</i> <i>ipr[Ppep1-mcherry-um-pep1]ips</i>	Phleo, Cbx	SG200 Δ pep1
SG200 Δ pep1-Uapep1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1::hph</i> <i>ipr[Ppep1-uapep1]ips</i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 Δ pep1
SG200 Δ pep1-Unpep1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1::hph</i> <i>ipr[Ppep1-unpep1]ips</i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 Δ pep1
SG200 Δ pep1-Mppep1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δpep1::hph</i> <i>ipr[Ppep1-mppep1]ips</i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200 Δ pep1

4.3.4 *U. hordei* - Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. hordei* - Stämme beschrieben (Tabelle 4).

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete *U. hordei* – Stämme

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
4875-5	<i>a1b1</i>		Lee <i>et al.</i> , 1999
8A	<i>a2b2</i>		ATCC 90511
4875-5 Δ pep1	<i>a1b1 Δuh-pep1::hph</i>	Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
8A Δ pep1	<i>a2b2 Δuh-pep1::hph</i>	Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009
4875-5 Δ pep1-umpep1	<i>a1b1 Δuh-pep1::hph ipr[Puhpep1-umpep1]ips</i>	Hyg, Cbx	hergestellt von D. Schwammbach
8A Δ pep1-umpep1	<i>a2b2 Δuh-pep1::hph ipr[Puhpep1-umpep1]ips</i>	Hyg, Cbx	hergestellt von D. Schwammbach

4.3.5 *S. cerevisiae* - Stämme

Für die Untersuchung der Interaktion von Pep1 und POX12 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde der Stamm *S. cerevisiae* AH109 (Mata; Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich) (James *et al.*, 1996) verwendet. Dieser Stamm besitzt Auxotrophien für Tryptophan, Alanin, Histidin und Leucin.

4.3.6 Oligonukleotide

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Oligonukleotide aufgeführt. Die Oligonukleotide tragen neben der Laufnummer eine Bezeichnung, die zumeist auf die Verwendung, die Orientierung und enthaltene Restriktionsschnittstellen rückschließen lässt.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Laufnummer	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung/Referenz
OCFH9	XhoI-RSIATA- CFP_fwd	CTCGAGCGCTCGATCGCCACC GCCGTGAGCAAGGGCGAGGA GCTGTTC	Amplifikation von CFP für die Klonierung in BiFC-Vektoren
OCFH10	CFP_XmaI_rev	CCCGGGCTTGTACAGCTCGTC CATGCC	Amplifikation von CFP und mCherry für die Klonierung in BiFC-Vektoren
OCFH11	XhoI-RSIATA- cherry_fwd	CTCGAGCGCTCGATCGCCACC GCCGTGAGCAAGGGCGAGGA GGATAAC	Amplifikation von mCherry für die Klonierung in BiFC- Vektoren
OCFH47	Pep1_XmaI-rv	GTAACCCCGGGACATGCCAAA CATGCTACCGATTCC	Amplifikation von <i>pep1</i> aus gDNA
OCFH48	NdeI-BiFCinv- LB-fwd	GGAATTCCATATGTTAGCTTGC ATGCCTGCAGGTCC	Amplifikation der BiFC- Vektoren zur Entfernung der <i>multiple cloning site</i>
OCFH49	BiFCinv-LB-rev- HindIII	GGGAAGCTTCGTTACACCACA ATATATCCTGCCAAGATCTCTA ATTCCGGGG	Amplifikation der BiFC- Vektoren zur Entfernung der <i>multiple cloning site</i>
OCFH50	NdeI-BiFCinv- Tnos-fwd	GGAATTCCATATGGGGGATAA CGCAGGAAAGAACATGAAGGC C	Amplifikation der BiFC- Vektoren zur Entfernung der <i>multiple cloning site</i>
OCFH51	BiFCinv-Tnos- HindIII-rev	GGGAAGCTTCCCGATCTAGTA ACATAGATGACACCGCGCGC	Amplifikation der BiFC- Vektoren zur Entfernung der <i>multiple cloning site</i>
OCFH52	NcoI-cherry-fwd	CATACCATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGGATAAC	Amplifikation von mCherry aus p123-mCherry
OCFH53	cherry-SpeI-rv	CATACTAGTCTTGTACAGCTCG TCCATGCCGCC	Amplifikation von mCherry aus p123-mCherry
OCFH54	SpeI-RSIATA- Pep1-inv-fw	CTTACTAGTCGCTCGATCGCCA CCGCGGATGCTGCGGGTGGC GTAC	Inverse PCR auf p123-pep1 zur Klonierung von p123- mCherry-pep1
OCFH55	Pep1-inv.- SignalP-rev- NcoI	GTTCCATGGTGGCATGGACGG GAACGGTGCTGC	Inverse PCR auf p123-pep1 zur Klonierung von p123- mCherry-pep1
OCFH57	pep1-fw-deg1	ACGTTYTACTGGTTCTCSTCSG TCG	Amplifikation von <i>pep1</i> aus gDNA

OCFH58	pep1-fw-deg-2	ACGTTTTACTGGTWCTCSTCSG TCG	Amplifikation von <i>pep1</i> aus gDNA
OCFH59	pep1-rv-deg-1	CAAGMGGCTTGAGMGCSACGC A	Amplifikation von <i>pep1</i> aus gDNA
OCFH60	pep1-rv-deg-2	CRAGCGGCTTGAGCGCCACRC A	Amplifikation von <i>pep1</i> aus gDNA
OCFH66	ITS5-fw	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG G	Sequenzierung der ITS-Region der 18S-rDNA
OCFH67	ITS4-rv	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Sequenzierung der ITS-Region der 18S-rDNA
OCFH68	BamH1-optpep-fw	CGCGGATCCAATGTCCAAGCC CTTCCTCTC	Amplifikation des codonoptimierten <i>pep1</i> zur Klonierung in BiFC-Vektoren
OCFH69	optpep-XhoI-rv	CCGCTCGAGAATGGCGTAATC AGGGACATCGTAAGG	Amplifikation des codonoptimierten <i>pep1</i> zur Klonierung in BiFC-Vektoren
OCFH70	BamHI-PO12-fw	CGCGGATCCATGGCGGCTGCT ACTTCTTC	Amplifikation von <i>pox12</i> zur Klonierung in BiFC-Vektoren
OCFH71	PO12-XhoI-rv	CTTCTCGAGTAGCACGAGGCT ACCGGC	Amplifikation von <i>pox12</i> zur Klonierung in BiFC-Vektoren
OCFH74	EcoRI-SPYNE-fw	CGAATTCATCTCGAGCGCTCG ATCGCCAC	Amplifikation der BiFC-Vektoren für die Klonierung der Kontrollvektoren
OCFH75	OCFH75-Vicia-SP-rv-EcoRI	GGAATTCTAGCAAGGCAGGTG GAAGTGAAG	Amplifikation der BiFC-Vektoren für die Klonierung der Kontrollvektoren
OCFH117	NdeI-POX-fw	GATCACATATGATGGCCGAGG GGGCCAGGTAC	Amplifikation von POX12 zur Klonierung in Hefe-2-Hybrid-Vektoren
OCFH119	Xma-pep1-fw	CTATCCCGGGTATGGATGCTG CGGGTGCGGTACC	Amplifikation von Pep1 zur Klonierung in Hefe-2-Hybrid-Vektoren
OCFH120	pep1-Xho-rv	CCGCTCGAGTTACATGCCAAA CATGCTACC	Amplifikation von Pep1 zur Klonierung in Hefe-2-Hybrid-Vektoren
OCFH128	POX12-EcoRI-rv	CTCGAATTCCTAGAGCACGAG GCTACC	Amplifikation von POX12 zur Klonierung in Hefe-2-Hybrid-Vektoren
OCFH162	xba1-Mppep1-fw	GCGTCTAGAATGAGGATCACA CTCACAACCG	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>M. pennsylvanicum</i> in p123

OCFH163	Mppep1-Xma1-rv	CTCCCGGGTCAAAAACCAACC ATCTTGCC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>M. pennsylvanicum</i> in p123
OCFH164	p123-inv-xba1-rv	CATTCTAGACGAGAGTCCTCAG GATGGT	inverse PCR auf p123-pep1 zur Klonierung der <i>pep1</i> -Orthologe in p123
OCFH165	p123-inv-xma1-rv	CATAACCCGGGCGCTGCGACG TCGTTGATG	inverse PCR auf p123-pep1 zur Klonierung der <i>pep1</i> -Orthologe in p123
OCFH166	xba1-Unpep1-fw	GTGTCTAGAATGAAGCTCACAC TCAAC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>U. nuda</i> und <i>U. avenae</i> in p123
OCFH167	Unpep1-xma1-rv	CATCCCGGGTCAGAGCCCAAC CATCTTACC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>U. nuda</i> und <i>U. avenae</i> in p123
OCFH168	nde1-Uapep1-noleader-fw	GGAATTCCATATGGACGTCCCA CTCCCCGACTAC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>U. avenae</i> in pET15b
OCFH169	Uapep1-BamHI-rv	CATGGATCCCTAGAGCCCAAC CATCTTACC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>U. nuda</i> und <i>U. avenae</i> in pET15b
OCFH170	nde1-Unpep1-noleader-fw	GGAATTCCATATGGACGTCCCA CTCCCCAGCTAC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>U. nuda</i> in pET15b
OCFH171	nde1-Mppep1-noleader	GGAATTCCATATGGTTGATACC TCTACGGGAGTAG	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>M. pennsylvanicum</i> in pET15b
OCFH172	Mppep1-Bamh1-rv	CGTGGGATCCTCAAAAACCAA CCATCTTGCC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>M. pennsylvanicum</i> in pET15b
OCFH173	Xba1-Mppep1-fw(short)	GCGTCTAGAATGAGGATCAC	Klonierung von <i>pep1</i> aus <i>M. pennsylvanicum</i> in p123
CH75	POD_pB3-3_fw	CCCAAGCTTTGCTGTCCTTCCT GGCGA	Amplifikation des ersten zmPOX12si-Fragments, zur Integration in den Vektor pB3-3. (Herrberger, 2012)
CH76	POD_pB3-3_rv	CCCAAGCTTCACGTAGTACTTG TTGTC	Amplifikation des ersten zmPOX12si-Fragments, zur Integration in den Vektor pB3-3. (Herrberger, 2012)
CH77	POD_FragII_fw	CCCAAGCTTACGCCCAACGCC TTCGAC	Amplifikation des zweiten zmPOX12si-Fragments, zur Integration in den Vektor pB3-3. (Herrberger, 2012)

CH78	POD_FragII_ rv	CCCAAGCTTCCATCTTGACGTA GGAGT	Amplifikation des zweiten zmPOX12si-Fragments, zur Integration in den Vektor pB3- 3. (Herrberger, 2012)
Olex 21	EcoRI_ um01987_fw	CCGGAATTCATGATGACCACAC TGGTGCAAAC	Amplifikation von <i>pep1</i> aus gDNA, hergestellt von A. Hof

4.3.7 Plasmide

Die nachfolgend aufgeführten Vektoren wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Wurden Plasmidteile mittels PCR amplifiziert, so wurde die Sequenz des inserierten DNA-Abschnitts durch Sequenzierung überprüft. Soweit nicht anderes vermerkt vermitteln die Plasmide eine Ampicillin-Resistenz.

Plasmide zur Genexpression 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 T7lac-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- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) reguliert werden. Durch die 5'-Ende Fusion an eine Sequenz, welche für einen Hexahistidin-tag (His₆-tag) kodiert, ist es möglich, die exprimierten Proteine über das Ni-NTA-System aufzureinigen.

pET15b-Pep1 (Hemetsberger *et al.*, 2012)

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 His₆-tag kodiert.

pET15b-Pep1 (Hemetsberger *et al.*, 2012)

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 His₆-tag kodiert.

Plasmide zur Generierung stabiler *U. maydis* - Mutanten

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide sowie die selbst hergestellten Plasmide beschrieben, die für die Herstellung 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 (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-pep1 (Doehlemann *et al.*, 2009)

Enthält das *pep1*-Gen unter der Kontrolle des nativen 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-mcherry (erhalten von G. Doehlemann)

Enthält das *mcherry*-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-mCherry:pep1

Dieses Plasmid wurde zur mikroskopischen Lokalisierung von Pep1 in der biotrophen Interaktion generiert. Dabei wurde das *pep1*-Gen N-terminal mit einer Sequenz fusioniert, die für das mCherry-Protein kodiert. Hierzu wurde p123-Pwt-pep1 mit dem Primerpaar OCFH54/OCFH55 amplifiziert. Zur Amplifikation von mCherry wurden die Primer OCFH 52/OCFH53 mit dem Plasmid p123-mcherry als Matrize verwendet. Die Klonierung erfolge über die Restriktionsschnittstellen SpeI und NcoI. 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-Uapep1

Dieses Plasmid wurde zur Komplementation des $\Delta pep1$ -Phänotyps in Maisinfektionen generiert. Enthält das *pep1*-Gen aus *U. avenae* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors

und des *nos*-Terminators. Für die Transformation von *U. maydis* kann das Plasmid durch Schnitt (z.B. mit Sspl) im *cbx*-Gen in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pwt-Unpep1

Dieses Plasmid wurde zur Komplementation des $\Delta pep1$ -Phänotyps in Maisinfektionen generiert. Enthält das *pep1*-Gen aus *U. nuda* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators. Für die Transformation von *U. maydis* kann das Plasmid durch Schnitt (z.B. mit Sspl) im *cbx*-Gen in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pwt-Mppep1

Dieses Plasmid wurde zur Komplementation des $\Delta pep1$ -Phänotyps in Maisinfektionen generiert. Enthält das *pep1*-Gen aus *M. pennsylvanicum* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators. Für die Transformation von *U. maydis* kann das Plasmid durch Schnitt (z.B. mit Sspl) im *cbx*-Gen in den *ip*-Lokus inseriert werden.

Plasmide für die Expression der eBiFC-Konstrukte in *N. benthamiana*

pUC-SPYNE-35S (Walter *et al.*, 2004)

Klonierungsvektor, enthält ein Leseraster zur Expression von Kandidatengen unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Enthält N-terminales *yfp*-Fragment zur Fluoreszenzkomplementation.

pUC-SPYNE-35S (Walter *et al.*, 2004)

Klonierungsvektor, enthält ein Leseraster zur Expression von Kandidatengen unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Enthält C-terminales *yfp*-Fragment zur Fluoreszenzkomplementation.

pGreen0000 (Hellens *et al.*, 2000)

Expressionsvektor zur Expression von Kandidatengen in *N. benthamiana*.

pUC57-Pep1hv

Klonierungsvektor, enthält codonoptimierte Version von *pep1* mit einem Sekretionssignal aus dem Legumin B4 - Gen aus *Vicia faba* (GenBank X03677.1) zur Expression in Pflanzen (Sequenz siehe Kap 6.2.8)

pGreen_SPYCE-CFP

eBiFC-Expressionsvektor zur Expression von Kandidatengen *N. benthamiana* unter der Kontrolle des 35S-Promoters. Zur Amplifikation von *cfp* aus p123-CFP wurde das Primerpaar OCFH9/OCFH10 verwendet, so dass eine N-terminale RSIATA-Linker-Sequenz eingefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI und XmaI in pUC-SPYCE-35S kloniert. Das offene Leseraster wurde anschließend über ein Restriktionsverdau mit HindIII und EcoRI in den Vektor pGreen0000 ligiert. Zur Entfernung überflüssiger Restriktionsschnittstellen in zwei *multiple cloning sites* wurden zwei inverse PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren OCFH48/OCFH49 und OCFH50/OCFH51 durchgeführt.

pGreen_SPYNE-mCherry

eBiFC-Expressionsvektor zur Expression von Kandidatengen *N. benthamiana* unter der Kontrolle des 35S-Promoters. Zur Amplifikation von *mCherry* aus p123-mCherry wurde das Primerpaar OCFH11/OCFH10 verwendet, so dass eine N-terminale RSIATA-Linker-Sequenz eingefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI und XmaI in pUC-SPYCE-35S kloniert. Das offene Leseraster wurde anschließend über Restriktionsverdau mit HindIII und EcoRI in den Vektor pGreen0000 ligiert. Zur Entfernung überflüssiger Restriktionsschnittstellen in zwei *multiple cloning sites* wurden zwei inverse PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren OCFH48/OCFH49 und OCFH50/OCFH51 durchgeführt.

pSPYCE-pep1

eBiFC-Expressionsvektor zur Expression von *pep1* in *N. benthamiana* unter der Kontrolle des 35S-Promoters. *pep1* wurde mittels des Primerpaars OCFH68/OCFH69 aus pUC57-Pep1hv amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in pGreen_SPYCE-CFP kloniert.

pSPYNE-pep1

eBiFC-Expressionsvektor zur Expression von *pep1* in *N. benthamiana* unter der Kontrolle des 35S-Promoters. *pep1* wurde mittels des Primerpaars OCFH68/OCFH69 aus pUC57-Pep1hv amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in pGreen_SPYNE-mCherry kloniert.

pSPYCE-POX12

eBiFC-Expressionsvektor zur Expression von *pox12* in *N. benthamiana* unter der Kontrolle des 35S-Promoters. *pox12* wurde mittels des Primerpaars OCFH70/OCFH71

aus Mais-cDNA amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in pGreen_SPYCE-CFP kloniert.

pSPYNE-POX12

eBiFC-Expressionsvektor zur Expression von *pox12* in *N. benthamiana* unter der Kontrolle des 35S-Promoters. *pox12* wurde mittels des Primerpaars OCFH70/OCFH71 aus Mais-cDNA (erhalten von Karina van der Linde) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in pGreen_SPYNE-mCherry kloniert.

pSPYCE-C

eBiFC-Kontrollvektor zur Negativkontrolle der Fluoreszenzkomplementation. Enthält *cfp* und das C-terminale *yfp*-Fragment hinter dem Legumin B4-Signalpeptid unter Kontrolle des 35S-Promoters. Erhalten durch inverse PCR mit dem Primerpaar OCFH74/OCFH75 auf pSPYCE-pep1 mit anschließender Religation zur Entfernung von *pep1*.

pSPYCE-N

eBiFC-Kontrollvektor zur Negativkontrolle der Fluoreszenzkomplementation. Enthält *mCherry* und das N-terminale *yfp*-Fragment hinter dem Legumin B4-Signalpeptid unter Kontrolle des 35S-Promoters. Erhalten durch inverse PCR mit dem Primerpaar OCFH74/OCFH75 auf pSPYNE-pep1 mit anschließender Religation zur Entfernung von *pep1*.

Plasmide für Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen

pGADT7 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

Dieses Plasmid kodiert für die Gal4-Aktivierungsdomäne und wurde sowohl als Kontrollplasmid (Leervektor) als auch als Ausgangsplasmid für Genfusionen mit *pep1*. Das Plasmid enthält den LEU2 Auxotrophiemarker.

pGBKT7 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

Dieses Plasmid kodiert für die Gal4-Bindedomäne und wurde sowohl als Kontrollplasmid (Leervektor) als auch als Ausgangsplasmid für Genfusionen mit *pox12*. Das Plasmid vermittelt eine Kan-Resistenz und enthält außerdem den TRP1 Auxotrophiemarker.

pGADT7-pep1

Plasmid zur Expression von *pep1* im Hefe-2-Hybrid-Experiment. *pep1* wurde durch das Primerpaar OCFH119/OCFH120 aus p123-pep1 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen XmaI und XhoI in pGADT7 kloniert.

pGBKT7-pox12

Plasmid zur Expression von *pox12* im Hefe-2-Hybrid-Experiment. *pox12* wurde durch das Primerpaar OCFH117/OCFH128 aus Mais-cDNA (erhalten von Karina van der Linde) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen XmaI und XhoI in pGADT7 kloniert.

Plasmide für das virusinduzierte 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 (Hemetsberger *et al.*, 2012)

Für das *Silencing* der Peroxidase-12 aus Mais, wurden zwei *Silencing*-Konstrukte erstellt. Zur Amplifikation von Fragment 1 wurden die Primer CH75 und CH76 verwendet. Als Matrize diente cDNA der Maisvarietät *Zea mays 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 (Hemetsberger *et al.*, 2012)

Für das *Silencing* der Peroxidase-12 aus Mais wurden zwei *Silencing*-Konstrukte erstellt. Zur Amplifikation von Fragment 2 wurden die Primer CH77 und CH78 verwendet. Als Matrize diente cDNA der Maisvarietät *Zea mays 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 Rubidiumchlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.*, (1972). Zur Herstellung transformations-kompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium, dem 10 mM MgCl₂ sowie 10 mM MgSO₄ zugesetzt wurden, mit 1 ml einer frischen *E. coli* - Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 U/min 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 U/min, 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 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 sec. bei 42 °C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz, mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 - 60 min bei 800 U/min bei 37 °C in einem Heizschüttler (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

RF1-Lösung	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂ *4 H ₂ O
	30 mM	K-Acetat
	10 mM	CaCl ₂ *2 H ₂ O

	15% (v/v)	Glycerin
	in H ₂ O _{bid.} pH 5,8 (Acetat), sterilfiltriert	
RF2-Lösung	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂ *2 H ₂ O
	15% (v/v)	Glycerin
	in H ₂ O _{bid.} pH 5,8 (NaOH), sterilfiltriert	

4.4.2 Transformation von *A. tumefaciens* durch Elektroporation

Eine frische Übernachtkultur wurde dazu 1:100 in 500 ml dyt-Medium verdünnt und bei entsprechender Temperatur und 200 U/min bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 U/min, 15 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5 bis 1 ml kaltem 10%-igem Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Transformation wurden die elektrokompententen Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 µl Zellsuspension wurden mit bis zu 5 µl DNA gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls (1,8kV) ausgelöst. Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 60 min bei entsprechender Temperatur inkubiert und anschließend auf selektiven Platten ausgestrichen.

4.4.3 Transformation von *U. maydis*

Es wurde ein modifiziertes Protokoll zur Transformation von *U. maydis* verwendet (Gillissen *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine Übernachtkultur (28 °C, 200 U/min) in 50 ml

YEPS angesetzt. Bei einer OD600 = 0,4 – 0,8 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (3000 U/min, 10 min, 4 °C, Biofuge Stratos), anschließend einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS/Novozym-Lösung (7 mg/ml) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei RT für 8 – 12 min, der Grad der Protoplastierung wurde mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden 10 ml SCS (4 °C) zugegeben und die Zellen abzentrifugiert (3000 U/min, 10 min, 4 °C, Biofuge Stratos). Zur vollständigen Entfernung des Novozyms wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit STC (4 °C) gewaschen und das Pellet in 0,5 ml STC (4 °C) resuspendiert. Die so gewonnenen Protoplasten wurden nun zu je 50 µl aliquotiert und entweder max. 3 h auf Eis aufbewahrt und transformiert oder zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurden 50 µl Protoplasten, 1-5 µl DNA (5 µg) und 1 µl Heparinlösung 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml STC/PEG zugegeben und nochmals für 15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf zweischichtige Selektiv-Reg-Agar-Platten ausplattiert (nur untere Schicht Material und Methoden mit Antibiotikum) und für 3 - 5 Tage bei 28 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden auf entsprechenden Selektivmedien vereinzelt.

Puffer und Medien für die Transformation:

SCS	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
STC	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM CaCl ₂ 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
STC/PEG	15 ml STC 10 g PEG4000
Regenerationsagar (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	10 g Yeast Extract (Bacto) 4 g Pepton (Bacto) 4 g Saccharose 182,2 g Sorbitol (Sigma) 15 g Agar (Difco)

4.4.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Die PEG-vermittelte Transformation von *S. cerevisiae* - Stämmen erfolgte wie in der Anleitung des „Matchmaker Two-Hybrid System 3“ von Clontech (LaJolla/USA) beschrieben.

4.4.5 Blau-Weiß-Selektion von *E. coli*-Transformanden

Die korrekte Insertion des Konstruktes in Plasmide, die sich für die Blau-Weiß-Selektion eignen (beispielsweise pCR-TOPO2.1 und II), resultiert in einer Unterbrechung des *lacZ*-Gens, so dass keine funktionelle β -Galactosidase exprimiert wird, die X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff spaltet. Kolonien, in denen Plasmide mit Insert enthalten sind, bleiben somit auf X-Gal-haltigen Platten weiß und sind so leicht von den blauen Kolonien mit Vektoren ohne Insertion des gewünschten Konstrukts zu unterscheiden.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

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 μ g. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

X μ l DNA (0,5 - 5 μ g)

1,5 μ l enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer

1,5 μ l 10 x BSA (NEB)

0,5 U Restriktionsendonuklease

add 15 μ l H₂O_{bid.}

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 für 1 h bei RT.

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 Amplifikation von DNA-Längen bis zu 5 kb wurde die Phusion[®] Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn) verwendet. Die KOD Xtreme[™] Polymerase (Merck, Darmstadt) wurde für die inverse PCR auf Plasmide sowie für die Amplifikation von mehr als 5 kb eingesetzt. Die Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) oder der RedMix (enthält Taq-Polymerase, Bioline, Luckenwalde) wurde für Test-PCRs sowie für die Amplifikation 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 (Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1)
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 (Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1)
1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´ Strang)
1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´ Strang)
1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen, Darmstadt)
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: ca. 50 µg Matrizen-DNA
250 µM dNTPS (Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1)
1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´-Strang)
1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´-Strang)
1 x konzentrierter KCl - Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
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 ca. 50 µg Matrizen-DNA oder 1 µl Zellkultur bzw. 1 Kolonie
1 x konzentrierter RedMix
1,25 µM Primer 1 (bindet am 5´-Strang)
1,25 µM Primer 2 (bindet am 3´-Strang)

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

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.

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 *et al.* (1977) durchgeführt.

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

Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

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

4.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

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 U/min 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 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 14.000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurde das DNA-Pellet kurz getrocknet und 30 - 50 µl H₂O_{bid.} resuspendiert. Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde nach der Plasmidpreparation zusätzlich mit dem Wizard[®] SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

DNA-Präparation aus *U. maydis*

Es wurde ein modifiziertes Protokoll (nach Hoffmann & Winston, 1987) benutzt. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert (2 min, 13.000 U/min, RT, Heraeus Biofuge), der Überstand verworfen, 400 µl *Ustilago*-Lysis-Puffer, 500 µl Phenol/Chloroform und ca. 0,2 ml Glasperlen zugegeben und der Ansatz 5 min auf einem Vortexer (IKA Vibrax VXR) geschüttelt. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 15 min bei 13.000 U/min. 380 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation (2 min, 13.000 U/min, RT, Heraeus Biofuge) wurde der Überstand abgenommen und das Sediment in 50 µl TE/RNase (50 µg/ml) resuspendiert (15 min, 55 °C, 750 U/min, Thermomixer (Eppendorf)). Die DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

Ustilago-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM Na ₂ -EDTA 1 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}
Phenol/Chloroform	50 % (v/v) Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) 50 % (v/v) Chloroform

4.5.3 Southern Blot

Zunächst wurde die genomische DNA aus *U. maydis* - Transformanten isoliert (vgl. Kapitel 4.5.2) 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.

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 Herstellerprotokoll 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 µl auf 65 °C vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben. Nach halbstündiger Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65 °C (Hybrid Shake'n Stack, Thermo Electron

Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, hitzedenaturierte 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 ₂ HPO ₄ Lösung 2 - 1M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ 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 ₂ O _{bid.}
Southern-Waschpuffer	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bid.}
DIG1	0,1 M Maleinsäure, pH 7,5 0,15 M NaCl in H ₂ O _{bid.}
DIG2	1% (w/v) Milchpulver in DIG1

DIG3	0,1 M Maleinsäure, pH 9,5 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂
DIG-Wash	0,3 % (v/v) Tween-20 in DIG1
CDP-Star-Lösung	100 µl-CDP-Star (Roche, Mannheim) in 10 ml DIG3

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 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. 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 Inkubation erfolgte ÜN bei 37 °C und 200 U/min. 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 OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 angezogen. Zur Induktion der genomkodierte T7-RNA-Polymerase wurden anschließend 400 µM 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 U/min 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*.

4.6.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Die N- oder C-terminale Fusion eines Hexahistidin (His₆)-tags an rekombinant exprimierte Proteine, ermöglicht die Affinitätsreinigung, basierend auf der Chelatisierung immobilisierter Ni²⁺-Ionen auf Ni-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Säulenmaterial, durch die Imidazoliumgruppen des His₆-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 °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 °C sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat bei 15.000 U/min für 20 min, bei 4 °C zentrifugiert (SORVALL[®]-RC5B plus, Du Pont, Wilmington, USA). Parallel wurde eine Gravitationsdurchfluss-Säule mit einem Bettvolumen von 1,5 ml der Ni-NTA-Matrix (Ni-SepharoseTM 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 U/min und 4°C inkubiert. Danach wurde und 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 µl (Σ ~ 2,5 ml Eluat). Für weiterführende Experimente wurde der Puffer mittels illustra-NapTM25-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 Material und Methoden 90 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 ₂ O _{bid.}

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 ₂ O _{bid.}
Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7,9 in H ₂ O _{bid.}
Lagerungspuffer	100 mM Tris 150 mM NaC, pH 7,5 in H ₂ O _{bid.}

4.6.3 Auftrennung von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) angewandt. Diese Methode erlaubt es, denaturierte Proteine nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Zum vollständigen Denaturieren wird die Proteinlösung 5 min bei 99°C mit 1 x SDS-Gelladepuffer mit β-Mercaptoethanol (50 µl / 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-Rot) bestimmt. Ein typischer Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 120-160 V für ca. 1 h.

6 x SDS-Gelladepuffer	1,5 mM Tris-HCl pH 6,8 30 % (w/v) SDS 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 10 % 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

4.6.4 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 Proteinen im SDS-Gel oder auf PVDF-Membranen bis zu einer

Nachweisgrenze von 5 ng. Die Entfärbung von Gelen und Membranen erfolgt durch Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$.

4.6.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung löslicher Proteine in Proteinextrakten und Fraktionen gereinigten Proteins wurde mit Hilfe einer Methode nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) verwendet.

4.6.6 Luminolbasierte Quantifikation der Peroxidproduktion in Mais

Die elicitorvermittelte Peroxidproduktion in Mais wurde an Blattscheiben mit 6 mm Durchmesser durchgeführt. Eine Reaktionslösung wurde wie folgt frisch angesetzt: 80 μM Luminol (Sigma, Taufkirchen) und 0,15 U/ml HRP wurden in 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst. Die Messungen wurden in einer weißen 24-Kavitäten-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt. Das Assayvolumen betrug 1,5 ml, es wurde jeweils 1 ml Luminol-Reaktionslösung mit 500 μl Elicitorlösung versetzt. Zur Messung der Lumineszenz wurde ein Tecan Infinite M200 Plate Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) verwendet. Zunächst wurde eine Nullmessung für 5 min in 1-min-Intervallen durchgeführt, bevor der Elicitor injiziert wurde. Nach der Injektion des Elicitors wurde die Messung für 180 min fortgesetzt. Folgende Elicitorkonzentrationen wurden verwendet: 2 mg/ml Glycol-Chitosan (Sigma, Taufkirchen) und 2×10^8 Zellen/ml hitzeinaktivierter SG200-Zellen. Zur Hitzeinaktivierung wurden eine dichtgewachsene Flüssigkultur für 10 min bei 100 °C inkubiert, die Suspension anschließend abzentrifugiert und mit H_2O auf die angegebene Dichte eingestellt. Die eingesetzten Proteine wurden in 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) + 150 mM NaCl gelöst. Die Hitzeinaktivierung von Pep1 erfolgte durch Inkubation bei 99 °C für 5 min.

4.6.7 Nachweis von Wasserstoffperoxid durch Xylenorange-Färbung

Zur Messung der H_2O_2 -Produktion durch Xylenorange wurden 12 Mais-Blattscheiben mit 6 mm Durchmesser in einer 6-Kavitäten-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in 2 ml H_2O schwimmend inkubiert. Durch Zugabe von 2,5 mg/ml (f. c.)

Chitosan wurde ein *oxidative burst* ausgelöst. Nach 5 min wurden 120 µl aus der Kavität entnommen und die H₂O₂-Konzentration der Lösung wie folgt ermittelt:

Die folgenden Lösungen wurden frisch hergestellt:

Reagenz A	25 mM FeSO ₄ 25 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ in 2,5 M H ₂ SO ₄
Reagenz B	125 µM Xylenolorange 100 mM Sorbitol in H ₂ O _{bid.}

Direkt vor dem Experiment wurden 0,5 ml Reagenz A mit 50 ml Reagenz B gemischt. Zu je 1 ml Färbelösung wurden 100 µl Probe gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Messung der Absorption bei 560 nm (Safire Microplate Reader, Tecan, Männedorf, Schweiz). Gemessen wurden je 5 Replikate, als Nullwert fungierten 100 µl Wasser in 1 ml Färbelösung.

4.6.8 Messung der Peroxidaseaktivität durch Diaminobenzidinfärbung

Die *in vitro* - Aktivität der HRP wurde durch eine DAB-Färbung in einer durchsichtigen 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) nachgewiesen. Hierzu wurde eine Lösung aus 2,7 mM DAB (Sigma, Taufkirchen), 0,375 U/ml HRP und 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5 oder 7,5) verwendet und in Volumina von je 150 µl eingesetzt. Durch Hinzufügen von 2 µl 0,1 % H₂O₂ wurde die Präzipitation von DAB ausgelöst. Aufgereinigte Proteine wurden zuvor mit der Versuchslösung vorinkubiert, sofern zutreffend. 10 min nach der Zugabe von H₂O₂ wurde die Mikrotiterplatte in einem Epson V770 Photo Flachbettscanner (Seiko Epson Inc., Tokyo, Japan) gescannt und die Färbeintensität mittels Adobe Photoshop CS2 V. 9.02 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) wie folgt quantifiziert: Das Bild der gescannten Platte wurde in Graustufen konvertiert und invertiert. Daraufhin wurden die durchschnittlichen Grauwerte jeder Kavität mittels des Histogramm-Werkzeugs bestimmt. Zur Elimination des Hintergrundes wurden je 3 Kavitäten pro Platte mit Reaktionslösung ohne H₂O₂ befüllt, deren Grauwerte bestimmt und der Durchschnittswert von den Probenwerten subtrahiert.

4.6.9 Analyse von Proteininteraktionen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Pep1 und POX12 verwendet. Protein-Protein-Interaktionen wurden unter Mediumstringenzbedingungen (Selektion auf SD –Leu –Trp –His und ggf. α -X-Gal) mit dem Matchmaker Yeast-Two-Hybrid-System II (MATCHMAKER Library Construction & Screening Kit, BD Biosciences Clontech) und dem Hefewirtsstamm *S. cerevisiae* AH109 (Clontech) untersucht, bei dem die endogenen Gal4- und Gal80 Gene durch Deletionen inaktiviert sind. Die Untersuchungen wurden gemäß dem mitgelieferten Standardprotokoll ausgeführt.

4.7 Mikroskopie

4.7.1 Konfokale Mikroskopie

Sämtliche konfokalen Analysen wurden an einem TCS-SP5 Konfokal-Laserscan-Mikroskop (Leica, Bensheim) durchgeführt, die Steuerung des Mikroskops und Aufbereitung der Bilddaten erfolgte durch die Software Leica Application Suite (LAS, Leica, Bensheim). Für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden folgende Anregungs- und Detektionswellenlängen gewählt (Tabelle 6):

Tabelle 6: Verwendete Anregungs- und Detektionswellenlängen

Detektion	Anregungs- wellenlänge	Detektions- wellenlänge	Lasertyp
Zellwand-Autofluoreszenz; Calcofluor White; Annilinblau	405 nm	435 – 480 nm	405 Diode
CFP	458 nm	470 – 490 nm	Argon
GFP	488 nm	500 – 520 nm	Argon
YFP	514 nm	520 – 540 nm	Argon
RFP; mCherry; Propidiumiodid	561 nm	590 – 630 nm	561 DPSS

Anilinblau-Färbung von Callose

Zur Fluoreszenzmarkierung von Callose wurde Anilinblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Blattstücke von 1 – 2 cm Länge wurden in EtOH entfärbt und im Anschluss zweimal mit 50 % EtOH gewaschen. Es folgen zwei Waschungen mit 100 mM Na-Phosphatpuffer, pH 9,0. Schließlich wurden die Blattstücke in 0,05 % (w/v) Anilinblaulösung in 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 9,0 bei RT in Dunkelheit inkubiert. Es folgte die konfokale Mikroskopie in Färbelösung.

Färbung infizierter Maisblattproben mit WGA-AF488 und Propidiumiodid

Die Färbung diente der Visualisierung von Pilzhyphen (WGA-AF488) in infizierten Pflanzen. Zusätzlich wurden Pflanzenzellwände mit Propidiumiodid gegengefärbt. Die Blattproben wurden über Nacht in Ethanol entfärbt. Anschließend wurden sie für drei Stunden in 10 % KOH bei 85 °C inkubiert. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgt für 30 min, währenddessen wurden die Proben 3 x 1 min vakuumfiltriert. Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4 °C bis zur Analyse durch konfokale Mikroskopie gelagert.

WGA/AF-488	1 mg/ml in H ₂ O; Lagerung dunkel bei 4 °C
Propidium-Iodid	10 mg/ml in PBS (pH 7,4); Lagerung dunkel bei 4 °C
PBS, pH 7,4	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 137 mM NaCl
Färbelösung	20 µg/ml Propidiumiodid 10 µg/ml WGA-AF488 0,02 % Tween20 in 1x PBS (pH 7,4)

4.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung für die transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Studien wurden nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt (Bestwick *et al.*, 1997; Wi *et al.*, 2005). Dazu wurden kleine Blattstücke (ca. 1 mm²) für 1 h in 5 mM CeCl₃-Lösung (in 50 mM MOPS-Puffer pH 6,5) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer Mischung aus 2,5 % Paraformaldehyd und 2,5 % Glutaraldehyd in Puffer pH 7,2 für 90 min inkubiert, in Puffer gewaschen (4x 10 min) und schließlich in 1 % Osmiumtetroxid (in Puffer pH 7,2) inkubiert. Im Folgenden wurden die Proben mittels einer Acetonreihe dehydriert (50, 70, 90, 100 %, je 2x 10 min). Daraufhin wurde das Aceton durch Propylenoxid ersetzt und die Proben mit steigenden Konzentrationen von Agar 100 Epoxin (30, 60, 100 %) infiltriert und anschließend für 48 h bei 60 °C auspolymerisiert. Von den Proben wurden Ultradünnschnitte von 80 nm Dicke mittels eines Reichert Ultracut S Mikrotoms geschnitten. Diese wurden für 5 min mit 2 % Bleicitratlösung und für 15 min mit 1 % wässrigem Uranylacetat nachgefärbt, bevor sie mit einem Philips CM10 Transmissionselektronenmikroskop untersucht wurden.

4.8 Pflanzenmethoden

4.8.1 Virusinduziertes Gen-Silencing

Die Durchführung des virusinduzierten Gen-Silencings in Mais mittels des Brom-Mosaik-Virus (BMV) erfolgte nach van der Linde *et al.* (2011).

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 Systems (Promega, Mannheim) aufgereinigt und in 30 µl H₂O_{bid} 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 RNAs nach Herstellerangaben. Anschließend

wurde 1 ml des Reaktionsvolumens auf ein 1 % TAE-Gel aufgetragen und die Integrität der RNA überprüft.

Vermehrung des Brom-Mosaik-Virus 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 Minusstrang der RNA1 binden (KL39 und KL40), quantifiziert. Als Referenz wurden Primer, die an mRNA von Aktin binden, mitgeführt (KL81 und KL82). Die Extrakte wurden bei -20 °C gelagert.

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. Für Mais-Infektionen wurde jeweils das zweite Blatt, 6 Tage alter Maispflanzen (*Z. mays cv Va35*) mit Hilfe eines Pinsels 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 SG200Δpep1RFP 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.

Bestimmung der *Silencing* - Effizienz

Nach der mikroskopischen Analyse einer der Blatthälften des 6. Blattes der POX12si-Pflanzen, wurden solche Pflanzen, auf denen der *U. maydis* Stamm SG200Δpep1RFP Penetrationen zeigte, auf POX12-*Silencing* überprüft. Die *Silencing*-Effizienz wurde mittels quantitativer realtime-PCR überprüft. Insgesamt wurden 8 POX12si-Pflanzen

analysiert. Als Kontrolle wurden 7 mit SG200 Δ pep1rfp infizierte YFPsi-Pflanzen mitgeführt. Zur Datennormalisierung wurde die relative Menge an GAPDH-mRNA bestimmt.

Quantitative *real time* PCR

Für die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) 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 μ g RNA mittels des „Superskript III First Strand Synthesis SuperMix“ (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA revers transkribiert. 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 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 wurde 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.

4.8.2 *Zea mays*

Maiskultivare (*Zea mays* sp.)

Für Infektionsversuche wurde der Kultivar *Early Golden Bantam* verwendet (Olds Seeds, Madison/USA). Für die VIGS-Experimente wurde der Kultivar VA35 verwendet, der freundlicherweise von M.J. Millard vom Maize Genetics Cooperation Stock Center (Urbana, IL, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

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 auf 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 Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert. Für die VIGS-Experimente wurde

Zea mays 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.

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

Die zu infizierenden Stämme wurden vorher über Nacht in YEPS-light-Flüssigmedium bis zu einer OD600 von 0,6 - 0,8 angezogen. Dann wurde die Kultur geerntet (3.500 U/min, 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und in sterilem Wasser resuspendiert, so dass eine OD600 von 1,0 erreicht wurde. Bei Standardinfektionen wurden 200 bis 500 µl dieser *U. maydis* Suspension mittels einer 1 ml Injektionsspritze (Omnifix-F, B-Braun AG, Melsungen) in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen des Kultivars *Early Golden Bantam* injiziert. 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 durchstoßen.

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 7) klassifiziert. Die Pathogenität von Mutanten wurde aus den gewonnenen Werten von mindestens drei unabhängigen Infektionen von je 40 Pflanzen gemittelt (Kämper *et al.*, 2006).

Tabelle 7: Klassifizierung der Infektionen von Maispflanzen mit *U. maydis*

Symptom	Beschreibung
Nekrosen	Blätter weisen Braunfärbungen und nekrotische Läsionen auf, keine Tumorbildung
Chlorosen	Gelbliche Verfärbungen in infizierten Pflanzenteilen
Kleine Tumore	Kleine Tumore bis max. 1 mm Durchmesser
Tumore	Tumore > 1mm Durchmesser
Große Tumore	Sehr starke Tumorbildung, die zu einer Verkrümmung der Sprossachse führt

4.8.3 Tabak

Tabakvarietäten (*Nicotiana sp.*)

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

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 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 Temperatur betrug 20 °C und die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 40 %. Die Beleuchtungsintensität betrug während der Tagphase 26.000 Lux.

Transiente *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *N. benthamiana*

Zur Infektion von *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens* wurden Stämme, die die gewünschten Plasmide enthielten, in dYT-Medium aerob angezogen und bei einer OD_{600nm} von 0,2 mit 125 µM Acetosyringon (Sigma-Aldrich, Weinheim) versetzt. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 wurden die Zellen geerntet und in Induktionsmedium (125 µM Acetosyringon, 10 mM MgCl₂, 10 mM MES/KOH, pH 5,4) auf eine OD_{600nm} von 1 gebracht. 3-6 Wochen alte Tabakpflanzen wurden mit einer 1 ml Plastikspritze (Omnifix-F, B-Braun AG, Melsungen) ohne Nadel auf der

Blattunterseite mit der Suspension infiltriert. Die Pflanzen wurden nach der Infektion für 48 h im Gewächshaus unter abgeschalteten Lampen stehen gelassen und anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

4.8.4 Präparation von apoplastischer Flüssigkeit aus Pflanzenblättern

Für die Isolation von apoplastischer Flüssigkeit aus den Blättern der untersuchten Pflanzenarten wurden die Blätter geerntet, mittig im rechten Winkel zur Blattachse durchgeschnitten und direkt in H_2O_{bid} aufgenommen. Im Folgenden wurden die Blätter in einer Vakuumkammer je 5 mal für 15 min bei 400 mbar evakuiert. Anschließend wurden die Blattabschnitte gestapelt und mit der Schnittkante nach unten in 20 ml Spritzen (Servoprax, Wesel) gesteckt. Die Spritze wurde nun mit der kleinen Öffnung nach unten in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gestellt und so für 20 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. Die so extrahierte Flüssigkeit wurde aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.9 Bioinformatische Analysen

Nukleotidsequenzen wurden der Datenbank GenBank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen. Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiche erfolgten mit dem Programm Clonemanager 9.0 durch *Sequence Assembly / Fast Scan Method* (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA).

5. Literaturverzeichnis

Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B., and Martin, G.B. (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J* 22, 60-69.

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.

Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E., and Beynon, J.L. (2004). Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* 306, 1957-1960.

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.

Anderson, R.G., Casady, M.S., Fee, R.A., Vaughan, M.M., Deb, D., Fedkenheuer, K., Huffaker, A., Schmelz, E.A., Tyler, B.M., and McDowell, J.M. (2012). Homologous RXLR effectors from *Hyaloperonospora arabidopsidis* and *Phytophthora sojae* suppress immunity in distantly related plants. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.05079.x

Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399.

Asada, K. (1999). The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 50,601-639.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994). Preparation and analysis of RNA. *Curr Protoc Mol Biol* 116, 31-36

Baker, C.J., and Orlandi, E.W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu rev phytopath phytopathology* 33, 299-321.

Bakkeren, G., Kamper, J., and Schirawski, J. (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol* 45 Suppl 1, 15-21.

Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu rev Genet* 29, 179-208.

Banuett, F., and Herskowitz, I. (1994). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Gen Dev* 8, 1367-1378.

Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Gen Dev* 122, 2965-2976.

Basse, C.W., and Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Pathol* 5, 83-92.

Bauer, R., Oberwinkler, F., and Vánky, K. (1997). Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can J Bot* 75, 1273-1314.

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.

- Bennett, R.N., and Wallsgrave, R.M.** (1994). Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. *New Phytol* 127, 617-633.
- Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szoke, H., Henriksen, A., and Hajdu, J.** (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* 417, 463-468.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H., and Mansfield, J.W.** (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209-221.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., and Mansfield, J.W.** (1998). Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* 118, 1067-1078.
- Bhuiyan, N.H., Selvaraj, G., Wei, Y., and King, J.** (2009). Role of lignification in plant defense. *Plant Sig Beh* 4, 158-159.
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D.R., et al.** (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J* 47, 851-863.
- 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 Ca²⁺. *New Phytologist* 151, 185-194.
- Birch, P.R., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S., and Beynon, J.L.** (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* 14, 8-11.
- Bishop, J.G., Ripoll, D.R., Bashir, S., Damasceno, C.M., Seeds, J.D., and Rose, J.K.** (2005). Selection on Glycine beta-1,3-endoglucanase genes differentially inhibited by a *Phytophthora* glucanase inhibitor protein. *Genetics* 169, 1009-1019.
- 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.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology (Reading, England)* 147, 1395-1401.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68, 441-450.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46, 189-214.
- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Rev Plant Biol* 60, 379-406.
- 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., 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.
- Bolwell, G.P., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F., Rowntree, E.G., and Wojtaszek, P.** (1999). Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. *Free Rad Res* 31 Suppl, S137-145.

- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R., and Zimmerlin, A.** (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad Res* 23, 517-532.
- 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., et al.** (2010). *Phytophthora infestans* effector Avr3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 9909-9914.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., and Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 42, 1047-1063.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., and Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu Rev Phytopath* 47, 423-445.
- Broomfield, P.L., and Hargreaves, J.A.** (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Gen* 22, 117-121.
- 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.
- Coll, N.S., Eppe, P., and Dangl, J.L.** (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Diff* 18, 1247-1256.
- Couch, B.C., and Kohn, L.M.** (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94, 683-693.
- D'Autreaux, B., and Toledano, M.B.** (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 813-824.
- Damasceno, C.M., Bishop, J.G., Ripoll, D.R., Win, J., Kamoun, S., and Rose, J.K.** (2008). Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 820-830.
- 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* 24, 275-287.
- Davies, B., and Edwards, S.W.** (1989). Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid. *Biochem J* 258, 801-806.
- Davin, L.B., and Lewis, N.G.** (2005). Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr Opin Biotechnol* 16, 407-415.
- de Jonge, R., and Thomma, B.P.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* 17, 151-157.

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.

DeRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.B., Nomura, K., and He, S.Y. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9927-9932.

Deising, H.B., Werner, S., and Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect* 2, 1631-1641.

Delannoy, E., Jalloul, A., Assigbetse, K., Marmey, P., Geiger, J.P., Lherminier, J., Daniel, J.F., Martinez, C., and Nicole, M. (2003). Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 1030-1038.

Diethelm, R., Miller, M.G., Shibles, R., and Stewart, C.R. (1990). Effect of Salicylhydroxamic Acid on Respiration, Photosynthesis, and Peroxidase Activity in Various Plant Tissues. *Plant Cell Physiol* 31, 179-185.

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.

Djamei, A., and Kahmann, R. (2012). *Ustilago maydis*: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. *PLoS pathogens* 8, e1002955.

Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., *et al.* (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478, 395-398.

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., 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 pathogens* 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., *et al.* (2008a). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* 56, 181-195.

Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R.P., Kamper, J., and Kahmann, R. (2008b). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* 165, 29-40.

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, S., Yin, W., Kong, G., Yang, X., Qutob, D., Chen, Q., Kale, S.D., Sui, Y., Zhang, Z., Dou, D., *et al.* (2011). *Phytophthora sojae* avirulence effector Avr3b is a secreted NADH and ADP-ribose pyrophosphorylase that modulates plant immunity. *PLoS pathogens* 7, e1002353.

Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1, 316-323.

- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X., and Tyler, B.M.** (2008). RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20, 1930-1947.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kamper, J., Muller, P., and Kahmann, R.** (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18, 3332-3345.
- Ellis, J.G., Dodds, P.N., and Lawrence, G.J.** (2007). The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr Opin Microbiol* 10, 326-331.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., and Raskin, I.** (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70, 879-886.
- Estevez, J.M., Leonardi, P.I., and Alberghina, J.S.** (2008). Cell wall carbohydrate epitopes in the green alga *Oedogonium bharuchaer*. *J Phycol* 44, 1257-1268.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein-phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J* 4, 307-316.
- Fiers, M., Golemić, E., Xu, J., van der Geest, L., Heidstra, R., Stiekema, W., and Liu, C.M.** (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a CLAVATA2-dependent pathway. *Plant Cell* 17, 2542-2553.
- Flor, H.H.** (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathol* 32, 653-669.
- Flor, H.H.** (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu rev Phytopathol* 9, 275-296.
- Frahry, G., and Schopfer, P.** (1998). Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleioidonium. *Phytochem* 48, 223-227.
- Freudenberg, K.** (1959). Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature* 183, 1152-1155.
- Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I., and Steinberg, G.** (2006). Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18, 2066-2081.
- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J.E., and Tsuyumu, S.** (2006). Suppression of Defense Response in Plants by the avrBs3/pthA Gene Family of *Xanthomonas spp.* *Mol Plant Microbe Interact* 19, 342-349.
- Gay, C., Collins, J., and Gebicki, J.M.** (1999). Hydroperoxide assay with the ferric-xyleneol orange complex. *Anal Biochem* 273, 149-155.
- Gechev, T.S., and Hille, J.** (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* 168, 17-20.
- 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.
- Göhre, V., and Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual review of phytopathology* 46, 189-215.

- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5, 1003-1011.
- Graham, R.C., Jr., and Karnovsky, M.J.** (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique *J Histochem Cytochem* 14, 291-302.
- 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., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4645-4649.
- Gunawardena, A.H.L.A.N., Greenwood, J.S., and Dengler, N.G.** (2004). Programmed Cell Death Remodels Lace Plant Leaf Shape during Development. *The Plant Cell Online* 16, 60-73.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2389-2393.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., and Alfano, J.R.** (2009). The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 1069-1080.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., and Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125, 563-575.
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM.** (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol*, 42:819–832.
- 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 pathogens* 8, e1002684.
- Herrberger, C.** (2012). Funktionelle Charakterisierung von Pep1, einem sekretierten Effektorprotein von *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- 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.
- Hogenhout, S.A., Van der Hoorn, R.A., Terauchi, R., and Kamoun, S.** (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 115-122.
- Holliday, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* 2, 204-230.
- Holliday, R.** (1964). The induction of mitotic recombination by mitomycin c in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* 50, 323-335.
- Holliday, R.** (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)* 3, 671-682.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu rev Phytopathol* 45, 101-127.

- Iriti, M., and Faoro, F.** (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant signaling & behavior* 4, 66-68.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Joosten, M.H., Cozijnsen, T.J., and De Wit, P.J.** (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367, 384-386.
- Juarez-Montiel, M., Ruiloba de Leon, S., Chavez-Camarillo, G., Hernandez-Rodriguez, C., and Villa-Tanaca, L.** (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Rev Iberoam Micol* 28, 69-73.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M., and Kämper, J.** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*, J.W. Kronstad, ed. (Dodrecht, the Netherlands: Kluwer academic publishers), 347-371.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., et al.** (2010). External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 142, 284-295.
- Kamoun, S.** (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu rev Phytopathol* 44, 41-60.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., et al.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444, 97-101.
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and van der Hoorn, R.A.L.** (2010). An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol* 154, 1794-1804.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318, 648-651.
- Keen, N.T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu rev Genet* 24, 447-463.
- Kelley, B.S., Lee, S.J., Damasceno, C.M., Chakravarthy, S., Kim, B.D., Martin, G.B., and Rose, J.K.** (2010). A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *Plant J* 62, 357-366.
- Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R.T.** (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 1130-1139.
- Khang, C.H., Berruyer, R., Giraldo, M.C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B.** (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* 22, 1388-1403.
- Knaggs, A.R.** (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat Prod Rep* 20, 119-136.
- Koeck, M., Hardham, A.R., and Dodds, P.N.** (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell Microbiol* 13(12), 1849-57.
- Kohen, R., and Nyska, A.** (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30, 620-650.

Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Korber, H., Redei, G.P., and Schell, J. (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8467-8471.

Koncz, C., and Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molec Gen Genet* 204, 383-396.

Kunkel, B.N., and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5, 325-331.

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, N., Bakkeren, G., Wong, K., Sherwood, J.E., and Kronstad, J.W. (1999). The mating-type and pathogenicity locus of the fungus *Ustilago hordei* spans a 500-kb region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 15026-15031.

Lehtonen, M.T., Akita, M., Kalkkinen, N., Ahola-livarinen, 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.

Li, W., Wang, B., Wu, J., Lu, G., Hu, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Zhao, Q., Feng, Q., Zhang, H., et al. (2009). The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AvrPiz-t encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene Piz-t. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 411-420.

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. *Phytochem* 72, 1124-1135.

Ma, W., and Guttman, D.S. (2008). Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Curr Opin Plant Biol* 11, 412-419.

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.

Mathe, C., Barre, A., Jourda, C., and Dunand, C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500, 58-65.

Mehdy, M.C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* 105, 467-472.

Memelink, J., Verpoorte, R., and Kijne, J.W. (2001). ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci* 6, 212-219.

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.

- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W.** (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 809-834.
- Misas-Villamil, J.C., and van der Hoorn, R.A.** (2008). Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr Opin Plant Biol* 11, 380-388.
- Morel, J.B., and Dangl, J.L.** (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Diff* 4, 671-683.
- Morgan, W., and Kamoun, S.** (2007). RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr Opin Microbiol* 10, 332-338.
- Morre, D.J.** (2002). Preferential inhibition of the plasma membrane NADH oxidase (NOX) activity by diphenyleneiodonium chloride with NADPH as donor. *Antioxid Redox Signal* 4, 207-212.
- Mueller, O., Schreier, P.H., and Uhrig, J.F.** (2008). Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* 279, 27-39.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S.Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313, 220-223.
- Nomura, K., Melotto, M., and He, S.Y.** (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8, 361-368.
- O'Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., and Bolwell, G.P.** (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236, 765-779.
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., Bozkurt, T.O., Chaparro-Garcia, A., Segretin, M.E., Stam, R., Schornack, S., Cano, L.M., et al.** (2010). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell Microbiol* 12, 705-715.
- Orbach, M.J., Farrall, L., Sweigard, J.A., Chumley, F.G., and Valent, B.** (2000). A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* 12, 2019-2032.
- Panstruga, R., and Dodds, P.N.** (2009). Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* 324, 748-750.
- 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.
- Pataký, J.K., and Chandler, M.A.** (2003). Production of huitlacoche, *Ustilago maydis*: timing inoculation and controlling pollination. *Mycologia* 95, 1261-1270.
- Pichorner, H., Couperus, A., Korori, S.A.A., and Ebermann, R.** (1992). Plant peroxidase has a thiol oxidase function. *Phytochem* 31, 3371-3376.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5, 308-316.
- Pitann, B., and Mühlhling, K.H.** (2009). The role of plasma membrane H⁺-ATPase and apoplastic pH in adaptation of maize (*Zea mays*) to salt stress. *Proc Intern plant Nutr Coll XVI*, Sacramento, USA <http://repositories.cdlib.org/ipnc/xvi/1085>

- Pogány, M., von Rad, U., Grün, S., Dongó, A., Pintye, A., Simoneau, P., Bahnweg, G., Kiss, L., Barna, B., and Durner, J.** (2009). Dual Roles of Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* Pathosystem. *Plant Physiol* 151, 1459-1475.
- Privat, J.P., Delmotte, F., Mialonier, G., Bouchard, P., and Monsigny, M.** (1974). Fluorescence studies of saccharide binding to wheat-germ agglutinin (lectin). *Eur J Biochem* 47, 5-14.
- 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*. *MPMI* 23, 1143-1150.
- Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A., and Soldatini, G.F.** (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *J Exp Bot* 54, 2529-2540.
- Rentel, M.C., Leonelli, L., Dahlbeck, D., Zhao, B., and Staskawicz, B.J.** (2008). Recognition of the *Hyaloperonospora parasitica* effector ATR13 triggers resistance against oomycete, bacterial, and viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1091-1096.
- Rivas, S., and Thomas, C.M.** (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu rev Phytopathol* 43, 395-436.
- 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.
- Ros Barceló, A.** (1997). Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* 176, 87-132.
- Rowell, J.B.** (1955). Segregation of sex factors in a diploid line of *Ustilago zaeae* induced by alpha radiation. *Science* 121, 304-306.
- Rubartelli, A., and Lotze, M.T.** (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trend Immunol* 28, 429-436.
- Sagi, M., and Fluhr, R.** (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126, 1281-1290.
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., Irieda, H., Yoshino, K., Yoshida, K., Matsumura, H., et al.** (2012). Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS pathogens* 8, e1002711.
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1.25-1.28
- Sanger, F., Nicklen, S. und A.R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* 74: 5463-5467.
- Sawyer, D.T., Gibian, M.J., Morrison, M.M., and Seo, E.T.** (1978). On the chemical reactivity of superoxide ion. *J Am Chem Soc* 100, 627-628.
- 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.

Schirawski, J., Mannhaupt, G., Munch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rossel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., et al. (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* 330, 1546-1548.

Schorneck, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17421-17426.

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.

Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M., Cammue, B.P., and De Bolle, M.F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Soc Franc Physiol Vegeta* 46, 941-950.

Shahidi, F., and Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards *J Agric Food Chem* 39,1527-1532.

Sharma, Y.K., and Davis, K.R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radic Biol Med* 23, 480-488.

Shewry, P.R., and Lucas, J.A. (1997). Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. *Adv Bot Res* 26, 135-192.

Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9, 261-270.

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., Bölker, M., and Kahmann, R. (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* 20, 299-312.

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.

Soanes, D.M., and Talbot, N.J. (2008). Moving targets: rapid evolution of oomycete effectors. *Trends in microbiology* 16, 507-510.

Song, J., Win, J., Tian, M., Schorneck, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A., and Kamoun, S. (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 1654-1659.

Spellig, T., Bottin, A., and Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics : MGG* 252, 503-509.

Steinberg, G., and Perez-Martin, J. (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trend Cell Biol* 18, 61-67.

Stergiopoulos, I., and de Wit, P.J. (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47, 233-263.

- Sutherland, M.W.** (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 39, 79-93.
- Takahashi, H., Kanayama, Y., Zheng, M.S., Kusano, T., Hase, S., Ikegami, M., and Shah, J.** (2004). Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant Cell Physiol* 45, 803-809.
- Takken, F.L.W., Albrecht, M., and Tameling, W.I.L.** (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 9, 383-390.
- Tang, M., and Smith, C.J.** (2001). Elicitor induced defence responses in medicago sativa. *New Phytologist* 149, 401-418.
- Taylor, W.R., Jones, D.T., and Segal, A.W.** (1993). A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci.* 2, 1675-1685.
- Thilmony, R., Underwood, W., and He, S.Y.** (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J* 46, 34-53.
- Thomma, B.P., HP, V.A.N.E., Crous, P.W., and PJ, D.E.W.** (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., 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 Physiol* 143, 364-377.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 517-522.
- Torres, M.A., Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141, 373-378.
- Tronchin, G., Poulain, D., Herbaut, J., and Biguet, J.** (1981). Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. Fluorescence and ultrastructural studies. *Eur J Cell Biol* 26, 121-128.
- Truman, W., de Zabala, M.T., and Grant, M.** (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J* 46, 14-33.
- 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 den Ackerveken, G.F.J.M., Van Kan, J.A.L., and De Wit, P.J.G.M.** (1992). Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J* 2, 359-366.

- 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 Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A.L., Kumlehn, J., and Doehlemann, G.** (2012a). A Maize Cystatin Suppresses Host Immunity by Inhibiting Apoplastic Cysteine Proteases. *Plant Cell* 24, 1285-1300.
- 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.
- van der Linde, K., Mueller, A., Hemetsberger, C., Kaschani, F., Van der Hoorn, R.A., and Doehlemann, G.** (2012b). The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant Sig Beh* 13, 2327-2330
- van Doorn, W.G.** (2011). Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J Exp Bot* 62, 4749-4761.
- van Doorn, W.G., and Woltering, E.J.** (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* 10, 117-122.
- van Doorn, W.G., and Yoshimoto, K.** (2010). Role of chloroplasts and other plastids in ageing and death of plants and animals: a tale of Vishnu and Shiva. *Ageing Res Rev* 9, 117-130.
- van Esse, H.P., van't Klooster, J.W., Bolton, M.D., Yadeta, K.A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P.J.G.M., and Thomma, B.P.H.J.** (2008). The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* 20, 1948-1963.
- van Kan, J.A.** (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci* 11, 247-253.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu rev Phytopathol* 44, 135-162.
- Vanholme, B., De Meutter, J., Tytgat, T., Van Montagu, M., Coomans, A., and Gheysen, G.** (2004). Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332, 13-27.
- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmuller, P.G., and Obinger, C.** (2010). Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500, 74-81.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu rev Phytopathol* 47, 177-206.
- Waadt, R., and Kudla, J.** (2008). In planta visualization of protein interactions using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *CSH Protoc* 2008, pdb prot4995.
- Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, et al.** (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, 40:428–438.
- 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.

Wertman, J., Lord, C.E., Dauphinee, A.N., and Gunawardena, A.H. (2012). The pathway of cell dismantling during programmed cell death in lace plant (*Aponogeton madagascariensis*) leaves. *BMC Plant Biol* 12, 115.

Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., et al. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450, 115-118.

Wi, S.G., Singh, A.P., Lee, K.H., and Kim, Y.S. (2005). The pattern of distribution of pectin, peroxidase and lignin in the middle lamella of secondary xylem fibres in alfalfa (*Medicago sativa*). *Annals of Botany* 95, 863-868.

Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., et al. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* 18, 74-80.

Zamocky, M., Furtmuller, P.G., and Obinger, C. (2009). Two distinct groups of fungal catalase/peroxidases. *Biochem Soc Trans* 37, 772-777.

Zamocky, M., Furtmuller, P.G., and Obinger, C. (2010). Evolution of structure and function of Class I peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500, 45-57.

Zamocky, M., Gasselhuber, B., Furtmuller, P.G., and Obinger, C. (2012). Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. *Arch Biochem Biophys* 525, 131-144.

Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kamper, J., and Feldbrugge, M. (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 43, 727-738.

Zhang, J., and Zhou, J.M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol Plant* 3, 783-793.

Zhou, J., Lin, J., Zhou, C., Deng, X., and Xia, B. (2011). An improved bimolecular fluorescence complementation tool based on superfolder green fluorescent protein. *Acta Biochim et Biohys Sin* 43, 239-244.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.

6. Anhang

6.1 Zusätzliche Abbildungen

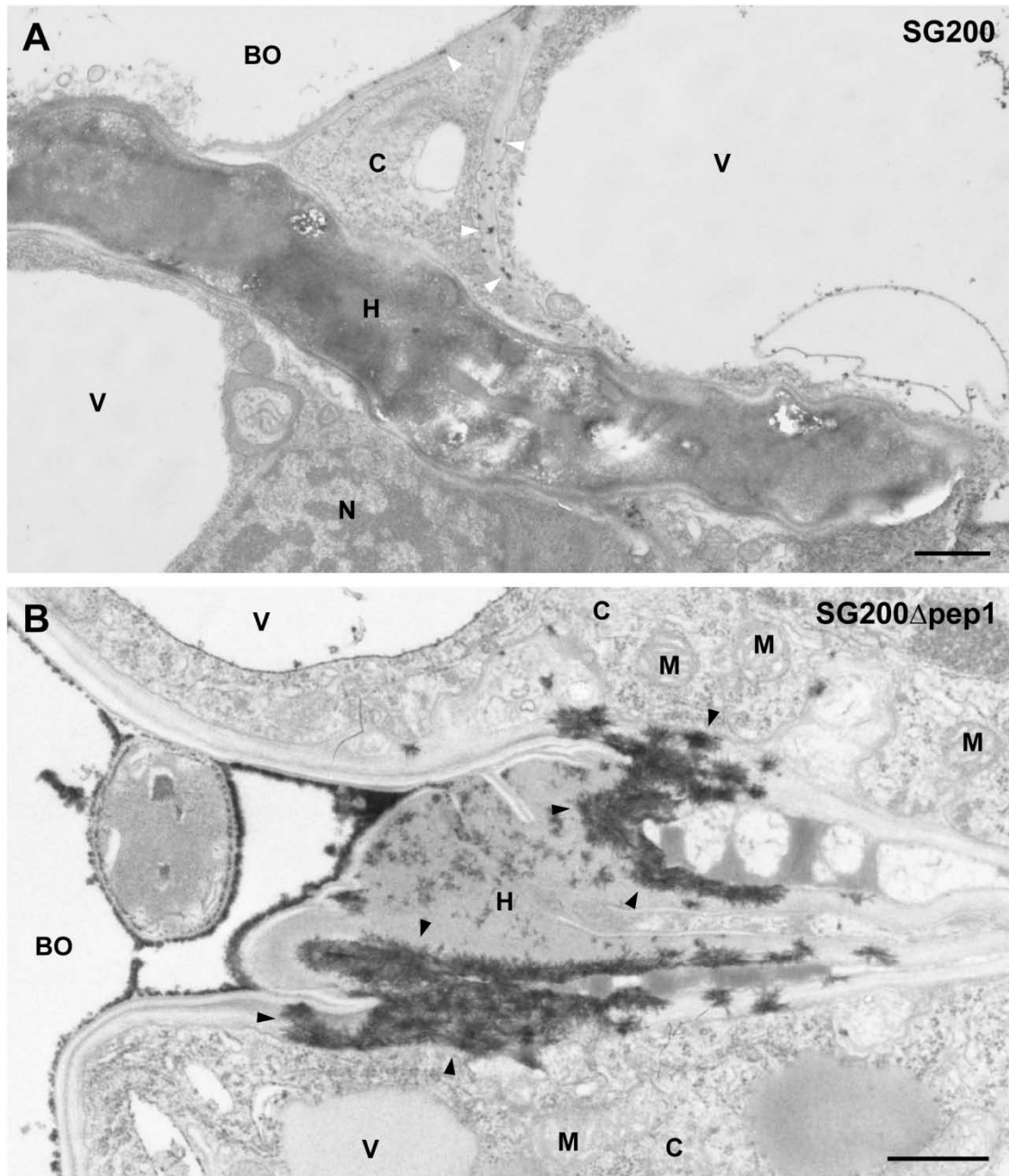


Abbildung 23: Die CeCl_3 – Färbung von Penetrationseignissen zeigt die ROS-Akkumulation in Δpep1 -Infektionen auf.

A: Penetration durch SG200. In einigen Fällen wurden CeCl_3 -Signale in einiger Entfernung von der eindringenden Hyphe beobachtet (weiße Pfeilspitzen). H: *Ustilago maydis* Hyphe V: pflanzl. Vakuole, C: pflanzl. Cytosol, N: Nukleus, M: Mitochondrium, BO: Blattoberfläche. **B:** Penetration durch SG200 Δpep1 . Eine starke Anhäufung von CeCl_3 an der eindringenden Hyphe (schwarze Pfeilspitzen) zeigt großen oxidativen Stress an. Maßstabsbalken: 1 μm .

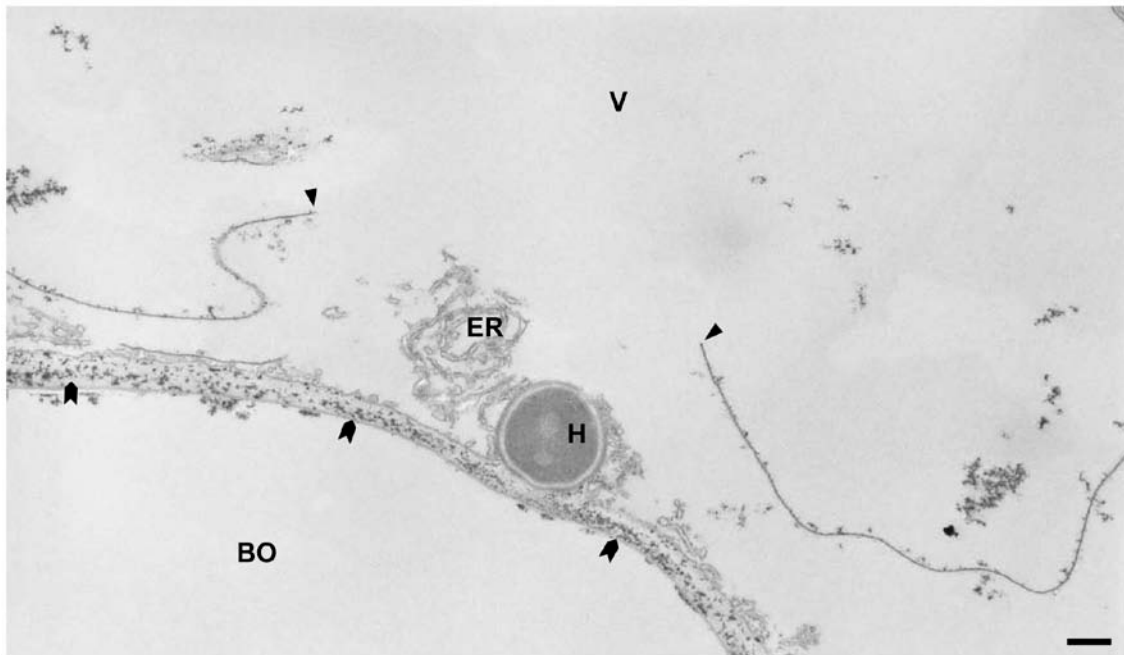


Abbildung 24: Programmierter Zelltod in SG200 Δ pep1 – infizierten Zellen.

TEM-Aufnahme einer Mais-Epidermiszelle, die nach einer Penetration durch SG200 Δ pep1 programmierten Zelltod ausgelöst hat. Man beachte die gerissene Tonoplastmembran (Pfeilspitzen) und den starken oxidativen Stress, angezeigt durch CeCl₃-Färbung in der Zellwand (Sparren). H: *Ustilago maydis* - Hyphe, ER: Endoplasmatisches Retikulum, V: pflanzl. Vakouole, BO: Blattoberfläche. Maßstabsbalken: 1 μ m.

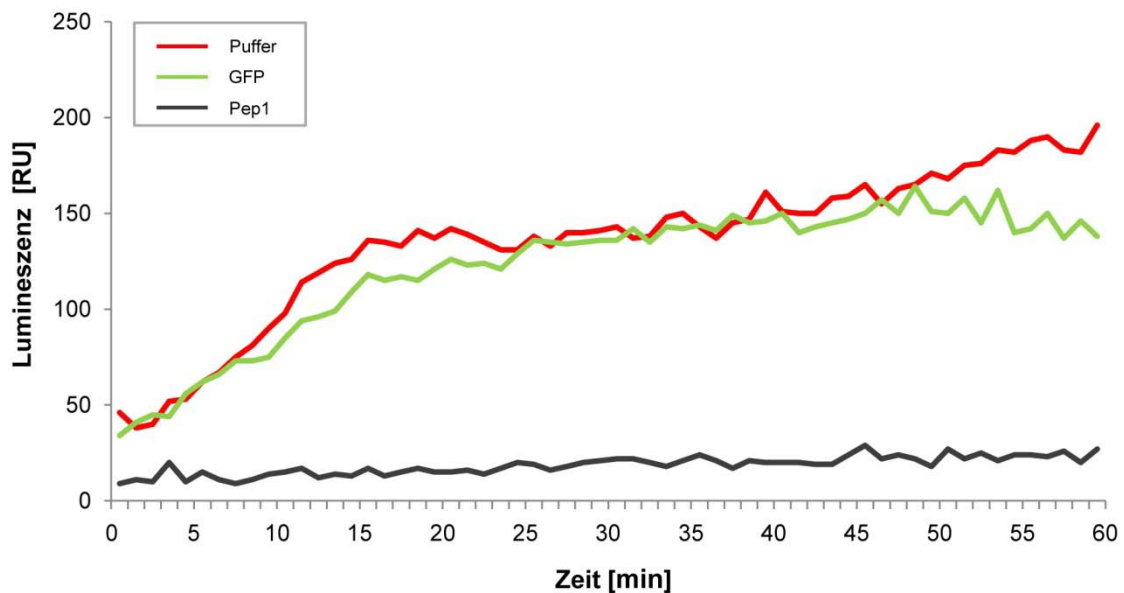


Abbildung 25: Pep1 inhibiert den elizitorvermittelten oxidative burst in Maisblättern.

Luminolbasierte grafische Darstellung der H₂O₂-Produktion in Mais-Blattscheiben, ausgelöst durch die Zugabe von 2x10⁸ Zellen/ml hitzeinaktivierter SG200-Zellen zum Zeitpunkt 1 min. Konzentrationen der zugegebenen rekombinanten Proteine: 10 μ M.

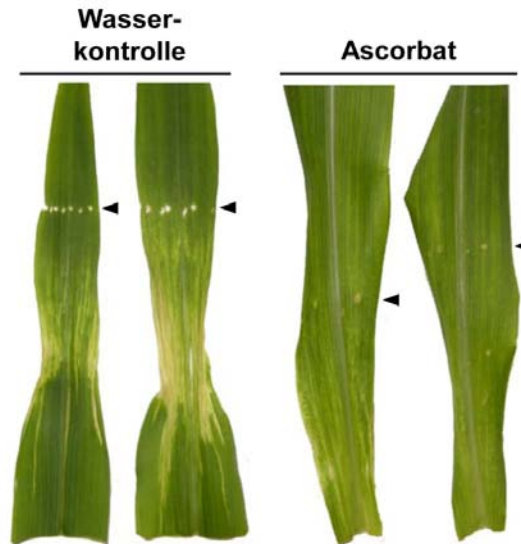


Abbildung 26: Pep1 Makroskopischer Phänotyp von Maisblättern drei Tage nach Infektion mit SG200 Δ pep1.

In Kontrollpflanzen wurde 12 und 24 h nach Infektion mit SG200 Δ pep1 Wasser injiziert. Diese Pflanzen weisen nekrotische Bereiche unterhalb der Infektionsstelle (Pfeilspitzen) auf. Pflanzen, die 12 und 24 hpi mit 5 mM Ascorbat behandelt wurden, zeigen weniger Anzeichen für programmierten Zelltod, es sind lediglich leichte Chlorosen unterhalb der Infektionsstelle zu erkennen.

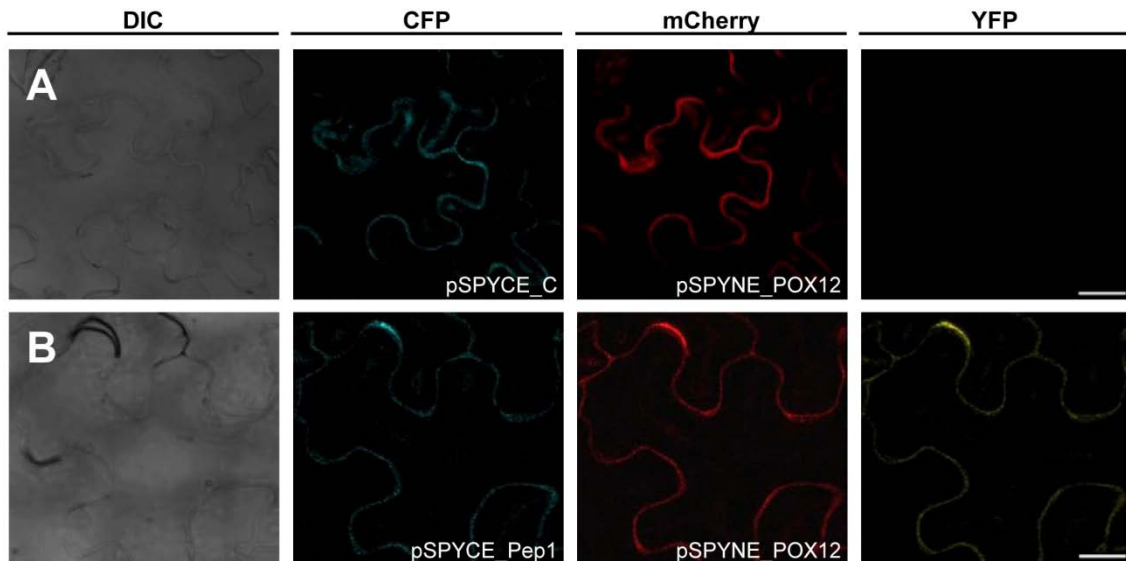


Abbildung 27: *In vivo* – Visualisierung der direkten Interaktion von Pep1 mit POX12.

Konfokalmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana* - Epidermiszellen, die eBiFC-Konstrukte exprimieren. **A:** Eine Epidermiszelle, die pSPYCE_C als Kontrolle und pSPYNE_POX12 coexprimiert. Der Blau- und der Rotkanal zeigen die Colokalisation der Signale im Apoplasten auf. Im YFP-Kanal kann keine Fluoreszenzkomplementation beobachtet werden. **B:** Eine Epidermiszelle, die PSPYCE_Pep1 und pSPYNE_POX12 coexprimiert. Auch hier colokalisieren das CFP- und das mCherry-Signal im Apoplasten. Zusätzlich ist eine apoplastische YFP-Fluoreszenz sichtbar, die das gleiche Lokalisationsmuster wie das Rot- und Blausignal aufweist. Dies deutet auf eine Fluoreszenzkomplementation durch physikalische Interaktion von Pep1 mit POX12 hin. Maßstabsbalken: 25 μ m. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Morten Hillmer durchgeführt.

6.2 Nukleotidsequenzen der verschiedenen *pep1*-Orthologe

6.2.1 Nukleotidsequenz von *pep1* aus *U. avenae*

ATGAAGCTCACACTCAACACCGCCTTCCTCCTCACCTCGCCTCGCTGCTGGTCATCAGCA
TCGACAGTGTAGACGCCGACGTCCCACTCCCCGACTACACTGCCCATGACTACCCACTCG
CCGCAACGTTTTACTGGTTCTCCTCCGTCGAAGTCGGAGTCTGCTACAGCCCTAAAGCTCG
CGTCGGTAGCATCAAAGGAGCACTCCACTGCACCCACCAAGAAAACACTACGATATTGAAAAC
AACACCTGGACGCTACCCAGACTTGCGTCGCTCTCAAGCCTCTTGGTGAACCTCTTTCCA
ACGCTGTGCGTGACTCGTGCAAAAACGCTAAAGGGAGTTTCAACCTCATCAAGCCTGCTTC
TAGCAATGCTGCCGGTAGCCAGGCTTACAACGCTATCAGCAACAAAGGTGCTGGTGGTGC
AGCATCTGACCCTGGCTCGCAGACTGGCAGTGACGATGACGAAGGTGACAAGAACAAGGA
TGGTGGCATGCTCGGCGGGTTAGGTAAGATGGTTGGGCTCCGCTCGATCGCCACCGCCA
TGGCATGA

6.2.2 Nukleotidsequenz von *pep1* aus *U. avenae*

ATGAAGCTCACACTCAACACCGCCTTCCTCCTCACCTCGCCTCGCTGCTGGTCATCAGCA
TCGACAGTGTAGACGCCGACGTCCCACTCCCCAGCTACATTGTCATGGACTACCCACTCG
CCGCAACGTTTTACTGGTTCTCCTCCGTCGAAGTCGGAGTCTGCTACAGCCCTAAAGCTCG
CGTCGGTAGCATCAAAGGAGCACTCCACTGCACCCACCAAGAAAACACTACGATATTGAAAAC
AACACCCGGACGCTACCCAGACTTGCCCTCGCTCTCAAGCCTCTTGGTGAACCTCTTTCCA
ACGCTGTGCGTGACTCGTGCGCAAACGCTAAAGGGAGTTTCAACATCATCAAGCCTGCTTC
TAACAATGCTGACGGTAACCAGGCTTCCGACTCTATCAGCAACAAAGGTGCTGGTGGTGC
AGCATCTGACCCTGGTTTCGCAGACTAGCAGTGAAGATGACGAAGGTGACAAGAAGAAGGA
TGGTGGCATGCTCGGCGGGTTAGGTAAGATGGTTGGGCTCCGCTCGATCGCCACCGCCA
TGGCATGA

6.2.3 Nukleotidsequenz von *pep1* aus *M. pennsylvanicum*

ATGAGGATCACACTCACAACCGTGCTTGCTACATTCGCAATCCTGCTGTTGCGCATCTGTGG
ACCAAGCTGTGCGGTTGATACCTCTACGGGAGTAGGTATTCCGGACTACCCGCCAATG
CGCCAGTGATTGCCTCGAGTTTCATCTGGTTTTCTTCGGTGGAAGTTGGCGTGTGCTACTC
ACCCGCCGCACGTCTCGGCAGCATCAAAGGAACCATCCACTGTACTCATCAAGAAAAGTA
CGATATTGACAACAACACTTGGACGCTTCCTCAGACTTGC GTT GCGCTCGGACCTTTGGGC
GGACCGTTGAGCAGCGGTGTGAGGGACGCATGTACCAATGCCAAGGGAACCTTTAACGTC
ATCACGCCAGCAGGTGCCAACACGGACGGAAGTCAAGCGTACAATGCCATTCAACAACAA
TCAGGCGGTGCTGGTGCTGGTGCTGGTGACGAGCGCTGACGACAGCGGTGATACTTCAAC
ACAGTCCAGCGGTGGCCCACTCAGCAGCTTAGGCAAGATGGTTGGTTTTTGA

6.2.4 Partielle Nukleotidsequenz von *pep1* aus *U. tritici*

ATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCAAG
CTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAC
GTTTTACTGGTTCTCGTCGGTCTGAAGTCGGAGTCTGCTACAGCCCTAAAGCTCGCGTCGG
TAGCATCAAAGGAGCACTCCACTGCACCCACCAAGAAAAATACGATCTTGAGAACAATACC
TGGACGCTACCCAGACTTGCCTCGCGCTCAAGCCTCTTGAAGGGCGAATTCTGCAGATA
TCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAG

6.2.5 Partielle Nukleotidsequenz von *pep1* aus *E. vaccinii*

TCGCCCTTACGTTTTACTGGTTCTCCTCGGTCTGAAGTCGGCGTTTGCTACAACCCGCAAGC
TCGCGTTGGCAGCATCAAAGGCGCTCTTCACTGCACACACCAAGAAAACACTACGA

6.2.6 Partielle Nukleotidsequenz von *pep1* aus *E. yoshinagai*

ATGAAGCTCACACTCAACACCGCCTTCCTCCTCACCCCTCGCCTCGCTGCTGGTCATCAGCA
TCGACAGTGTAGACGCCCTGGTCCCACACCCCGACTACACTGTCTATGACTACCCACTC

6.2.6 Codonoptimierte Nukleotidsequenz von *pep1* aus *U. maydis* zur Expression in *H. vulgare* und *N. benthamiana* (mit N-terminalem Sekretionssignal aus dem Legumin B4 - Gen aus *Vicia faba*)

ATGTCCAAGCCCTTCCTCTCGCTGCTGTCTCGCTCTCCCTTCTCCTCTTCACTTCCACCTGCC
TTGCTACTTCATCAGACGCTGCTGGCGCCGTTCCGCTGCCCACTTCAAGGTGGACCCAC
AGCCTCTTGCGTCTACATTCTACTGGTTCTCCAGCGTGGAGGTGGCGTTTTGCTACAACCC
CCAGGCCAGGGTGGGGTCGATCAAGGGCGCTCTCCACTGCACGCATCAGGAGAATTACG
ATAGGGACAACAATTCATACACACTGCCACAGACTTTCGCTCGCTCTTAAGCCTCTCGGCAA
GGCCTTCTTTTGAACGTTTCGCGATTCTGCACCAACGCTAAGGGGATCTTCAATGTGATT
GTCCCGGCCTCATCCAATGCCCTGGGCAGCCAGGCTTACGACGCCGTCAGGCTAAGGG
CGGGACCGGGCGGGACCGGCACCGACGATGACACGAGCGCCCCGATTCTAACGACCAG
GAGAAGAAGGGCGGGGGCCTCCTCGGCGGCATTGGGAGCATGTTCCGGCATGTACCCGTA
CGATGTGCCCGACTACGCCTACCCATACGATGTCCCGACTACGCCTACCCTTACGATGT
CCCTGATTACGCCTGA

Danksagung

Abschließend möchte ich allen Menschen danken, die einen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit hatten.

Mein besonderer Dank gilt Gunther Döhlemann für die Bereitstellung dieses spannenden Forschungsthemas und die Betreuung meiner Dissertation ebenso wie für anregenden wissenschaftlichen Diskurs und nicht zuletzt die Unterstützung beim Einwerben meines Dissertationsstipendiums.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Uwe Maier für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Organisation und Betreuung des DFG-Graduiertenkollegs 1216 „Inter- and Intracellular Transport and Communication“ danken, das während meiner Dissertation eine spannende Diskussionsplattform und interessante Workshops bereitgestellt hat.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und Frau Prof. Renate Renkawitz-Pohl für ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören. Frau Prof. Dr. Regine Kahmann möchte ich außerdem für Ihre Unterstützung beim Einwerben meines Stipendiums herzlich danken.

Für eine freundliche und wissenschaftlich fruchtbare Kooperation danke ich Herrn Dr. Bernd Zechmann von der Karl-Franzens-Universität in Graz. Ebenso danke ich meinem Bachelorstudenten Morten Hillmer für seinen unverdrossenen Einsatz bei den mikroskopischen Studien. Ein besonderer Dank ist meinem Kollegen Christian Herrberger gewidmet, der nicht davor zurückgeschreckt ist, gemeinsam das Geheimnis um Pep1 zu lüften. Ein großer Dank gebührt auch Daniela Aßmann als Ansprechpartner für alle großen und kleinen Fragen des Laboralltags.

Außerdem danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AGs Döhlemann, Kahmann und Zuccaro, die für hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen zur Verfügung standen, insbesondere Karina, Patrick und Gunther, die darüber hinaus auch für viele schöne Stunden Abseits der Wissenschaft zu haben waren. Ein Dankeschön geht auch an Fulk, der stets bereitwillig und kompetent willkommene Ablenkungen vom wissenschaftlichen Alltag anzubieten wusste.

Für die finanzielle und ideelle Förderung meiner Dissertation danke ich der Deutschen Bundesstiftung Umwelt.

Nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken, besonders meiner Mutter, die immer für mich da war und sich die Zeit für's Korrekturlesen nicht hat nehmen lassen, und Aybike, die ein schier unendlicher Quell der Motivation und Lebensfreude ist – seni çok seviyorum!

Lebenslauf

Christoph Florian Hemetsberger

geboren am 03. Juni 1982 in Marburg

Werdegang

seit 10/2009	Dissertation an der Philipps-Universität Marburg , durchgeführt am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abt. Organismische Interaktionen, bei PD Dr. Gunther Döhlemann. Thema der Forschungsarbeit: „Das Effektorprotein Pep1 und seine Rolle in der Biotrophie von Brandpilzen
04/2008 – 10/2008	Diplomarbeit an der University of Exeter, UK , School of Biosciences, bei Prof. Dr. Gero Steinberg. Thema der Diplomarbeit: „Entwicklung eines Mutantenscreens zur Identifikation von Komponenten des mikrotubuli-abhängigen Langstreckentransports in Hyphen von <i>Ustilago maydis</i> “
10/2004 – 12/2008	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
10/2002 – 09/2004	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
08/2001 – 06/2002	Zivildienst beim CBF Darmstadt
05/2001	Allgemeine Hochschulreife , Justus von Liebig Gymnasium, Darmstadt

Publikationen

Hemetsberger C*, Herrberger C*, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens* 2012 May; 8(5): e1002684.

van der Linde K, Hemetsberger C, Kastner C, Kashani F, van der Hoorn RAL, Kumlehn J, Doehlemann G. (2012) A maize cystatin suppresses host immunity by inhibition of apoplastic cysteine proteases. *Plant Cell*. 2012 Mar;24(3):1285-300.

van der Linde K, Mueller A, Hemetsberger C, van der Hoorn R, Kashani F, Doehlemann G. (2012) The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant Signaling and Behaviour*. 2012 Sep 7;7(11).

Abgrenzung der Eigenleistung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von mir selbständig ohne andere als die hier aufgeführte Hilfe durchgeführt. Dabei erfolgte die Konzipierung der Experimente und die Erstellung der Publikation „The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity“ in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Dr. Gunther Döhlemann und Christian Herrberger. Im Folgenden werden weitere an dieser Arbeit beteiligten Personen sowie deren experimentellen Beiträge genannt:

Christian Herrberger

Im Rahmen seiner Doktorarbeit führte Christian Herrberger folgende Teile der in Kapitel 2.1 präsentierten Experimente durch:

Silencing von *pox12* in Maispflanzen mit Hilfe des VIGS-Systems sowie Bestimmung des Expressionslevels von *pox12* und *yfp* in den *Silencing*-Pflanzen mittels qRT-PCR.

Bernd Zechmann

Im Rahmen einer Kooperation führte Bernd Zechmann transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen der Akkumulation von Peroxid in der biotrophen Interaktion von *U. maydis* mit *Z. mays* durch.

Morten Hillmer

Im Rahmen seiner Bachelorarbeit führte Morten Hillmer konfokalmikroskopische Untersuchungen der Interaktion von Pep1 mit POX12 mit Hilfe des BiFC-Systems in *N. benthamiana* durch.

Marburg, im November 2012

