

**Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters,  
das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert**



**DISSERTATION**

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

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Kerstin Schipper**  
aus Emsbüren

Marburg/Lahn, 2009



**Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters,  
das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert**

**DISSERTATION**

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

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Kerstin Schipper**  
aus Emsbüren

Marburg/Lahn, 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Anfang Oktober 2005 bis Februar 2009 unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann 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: 11.05.2009

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Regine Kahmann  
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Alfred Batschauer

Tag der mündlichen Prüfung: 4.06.2009

## ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters,  
das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

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

Marburg, März 2009

Kerstin Schipper

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
$\Delta$	Deletion	mM	Millimolar (mg/L)
Abb.	Abbildung	min	Minute
<i>ad</i>	zum Endvolumen auffüllen	N-terminal	aminoterminal
AF-x	Alexafluor-Wellenlänge in nm	OD <sub>x nm</sub>	optische Dichte gemessen bei x nm
As	Aminosäure	<i>on planta</i>	auf der Pflanzenoberfläche
Bp	Basenpaare	ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
bzw.	beziehungsweise	PCR	Polymerasekettenreaktion (“polymerase chain reaction”)
Cbx	Carboxin	PD	„potato dextrose“
cDNA	„complementary DNA“	Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
C-terminal	carboxyterminal	Q-PCR	quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion
DAPI	4', 6'-Diamino-2-Phenylindol	rev	„reverse“
DIC	„differential interference contrast“	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dpi	Tage nach Infektion („days post infection“)	RT-PCR	„reverse transcripton“ Polymerasekettenreaktion
D	Dalton	s.	siehe
d. h.	das heißt	secStp1	sekretierte Form des Stp1-Proteins inclusive Signalpeptid (As 1-515)
ER	Endoplasmatisches Retikulum	<i>stp1/Stp1</i>	<i>um02475/Um02475</i>
fw	„forward“	Stp1 $\Delta$ N	Stp1 Protein ohne N-terminales Signalpeptid (As 29-515)
gDNA	genomische DNA	U	Unit (Enzymaktivität)
ggf.	gegebenenfalls	u. a.	unter anderem
h/hrs	Stunde/Stunden	Upm	Umdrehungen pro Minute
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	vgl.	vergleiche
dH <sub>2</sub> O	einfach destilliertes Wasser	WGA	„wheat germ agglutinin“
hpi	Stunden nach Infektion („hours post infection“)	x <sup>R</sup>	Resistenz gegen x
<i>in planta</i>	innerhalb des Pflanzengewebes	z. B.	zum Beispiel
kb	Kilobasen		
kbp	Kilobasenpaare		
kDa	Kilodalton		
M	Molar (g/L)		

## Zusammenfassung

Der biotrophe Brandpilz *U. maydis* benötigt für seine Interaktion mit Maispflanzen eine Vielzahl neuartiger, vorhergesagt sekretierter Proteine, sogenannter Effektoren. Ein signifikanter Anteil der entsprechenden Gene liegt in Clustern vor, deren Expression erst während der biotrophen Phase erfolgt (Kämper *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Cluster 5B charakterisiert, dessen Deletion zum Verlust der Pathogenität führt (Kämper *et al.*, 2006). Cluster 5B codiert für drei Proteine, die ein N-terminales Signalpeptid besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich eines der Gene im Cluster 5B, *stp1*, für den Phänotyp verantwortlich ist. *stp1* findet sich auch in anderen verwandten Brandpilzen und stellt damit möglicherweise einen essentiellen Pathogenitätsfaktor von Brandpilzen dar.

Mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass *stp1* Deletionsmutanten im Gegensatz zu Infektionen mit Wildtypstämmen direkt nach Penetration der Maisepidermis arretieren und in infizierten Pflanzenzellen eine verstärkte Abwehrreaktion auslösen. Diese Abwehrreaktion war durch Papillenbildung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Akkumulation und verstärkte Synthese von PR-Proteinen gekennzeichnet und führte letztlich zum Absterben der infizierten Zellen. Dies zeigt, dass Stp1 diese Pflanzenabwehrreaktionen erfolgreich unterdrückt. Mit Hilfe von Promotor:*gfp* Fusionen wurde nachgewiesen, dass die Expression von Stp1 während der Penetration beginnt und vor allem auf in der Epidermis proliferierende Hyphen beschränkt ist.

In Stp1 konnten bioinformatisch keinerlei bekannte Proteindomänen gefunden werden, die auf die Funktion des Proteins hindeuten könnten. Durch Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die zentrale, Glycin-reiche Region des Proteins keine Funktion während der pathogenen Entwicklung hat, die N- und C-terminalen Bereiche hingegen essentiell sind.

Durch die Analyse von Kulturüberständen konnte nachgewiesen werden, dass Stp1 von *U. maydis* Hyphen in glykosylierter Form sekretiert wird. Nach Expression in haploiden Zellen wurde hingegen eine Prozessierung des Proteins durch die Kex2 Protease beobachtet. Die Ergebnisse deuten an, dass die Sekretion des Effektors einer genauen Kontrolle unterliegt, die sowohl transkriptionell als auch post-translational erfolgt.

Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Stp1-Fusionsproteine während der biotrophen Wachstumsphase von *U. maydis* in den Apoplasten gelangen. In einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurden ausschließlich intrazelluläre pflanzliche Interaktionspartner identifiziert. Stp1-Fusionsproteine, denen das N-terminale Signalpeptid fehlte, lokalisierten nach transienter Expression in *Nicotiana benthamiana* spezifisch in Subkompartimenten des Nukleus. Für einen der identifizierten Interaktionspartner konnte nach Co-Expression in *N. benthamiana* eine Colokalisierung mit Stp1 ohne Signalpeptid im Zellkern nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten andeuten, dass Stp1 nach Sekretion in Pflanzenzellen transloziert wird und dort in die Regulation von Abwehrreaktionen eingreift.

## Summary

For the biotrophic interaction with its host plant maize the corn smut fungus *U. maydis* depends on a variety of novel secreted effector proteins. A significant number of the corresponding genes are arranged in clusters and their expression is induced specifically during biotrophic growth (Kämper *et al.*, 2006). This study focuses on the characterization of the gene cluster 5B. Deletion of this cluster results in a complete loss of virulence symptoms in maize infections (Kämper *et al.*, 2006). Cluster 5B encodes three novel proteins that are predicted to be secreted via canonical N-terminal signal peptides. Deletion analyses revealed that only one of the genes, *stp1*, is responsible for the phenotype. Since *stp1* is also present in other closely related smut fungi this effector may represent a general pathogenicity factor.

Microscopic analyses revealed that *stp1* deletion mutants arrest directly after penetration in the maize epidermis. Furthermore, a strong plant defense response is elicited by *stp1* deletion mutants, that is characterized by the formation of papillae, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induction of *pr* genes and finally by death of infected plant cells. This suggests that Stp1 is able to suppress plant defense reactions. Using promoter:*gfp* fusions *stp1* expression was found to be induced during penetration and persists during growth in the maize epidermis.

Since there were no bioinformatic hints towards a function of Stp1, domain analyses were performed. It could be shown that the central glycine-rich region of Stp1 is not needed for protein function while the N- and C-terminal parts are essential during biotrophic growth.

Investigation of culture supernatants revealed that Stp1 is secreted in a glycosylated form by fungal hyphae. However, during expression in haploid sporidia the protein is processed by the Kex2 protease. These results demonstrate that Stp1 secretion is controlled at multiple levels including transcriptional as well as post-transcriptional mechanisms.

Using confocal microscopy Stp1 fusion proteins could be localised to the apoplastic interaction zone of infected plant cells. Five intracellular plant proteins were identified to interact with Stp1 in a yeast-two hybrid screen. After transient expression in *Nicotiana benthamiana* Stp1 lacking the signal peptide specifically localized to sub-compartments of the nucleus. Moreover, one of the interactors co-localized with Stp1 lacking the signal peptide after expression in *N. benthamiana*. These results might indicate that Stp1 is transferred to the plant cell where it is involved in regulation of defense responses.



**INHALTSVERZEICHNIS**

**ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE ..... I**

**ZUSAMMENFASSUNG ..... II**

**SUMMARY ..... III**

**INHALTSVERZEICHNIS ..... IV**

**1. EINLEITUNG ..... 1**

**1.1 Der Maisbranderreger *Ustilago maydis* ..... 1**

**1.2 Das *Ustilago maydis* / *Zea mays* Pathosystem ..... 2**

**1.3 *U. maydis* als Modellorganismus für phytopathogene Pilze ..... 6**

**1.4 Die Rolle sekretierter Effektoren in biotrophen Interaktionen..... 7**

**1.5 Die Bedeutung sekretierter *U. maydis* Effektoren für die pathogene Entwicklung... 11**

**1.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit ..... 14**

**2. ERGEBNISSE ..... 15**

**2.1 Das Cluster 5B aus *U. maydis* ..... 15**

2.1.1 Organisation des Genclusters 5B in *U. maydis* ..... 15

2.1.2 Konservierung des Clusters 5B in anderen pflanzenpathogenen Basidiomyceten ..... 16

**2.2 Identifizierung des Haupteffektorgens in Cluster 5B ..... 17**

2.2.1 Deletionsanalysen zur Identifizierung des Haupteffektorgens ..... 18

2.2.2 Komplementation der *stp1* Mutante ..... 20

2.2.3 Auswirkung der *stp1* Deletion in kompatiblen Wildtypstämmen ..... 21

2.2.4 Bioinformatische Analyse von Stp1 ..... 22

**2.3 Charakterisierung des Phänotyps von SG200 $\Delta$ stp1 Mutanten ..... 23**

2.3.1 Saprophytisches Wachstum von *stp1* Deletions- und Überexpressionsstämmen ..... 24

2.3.2 Mikroskopische Charakterisierung des Infektionsverlaufes von SG200 $\Delta$ stp1 ..... 25

**2.4 Charakterisierung der Pflanzenreaktion nach Infektion mit *stp1* Deletionsstämmen 30**

2.4.1 Detektion von Autofluoreszenz und Papillenbildung nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 .... 30

2.4.2 *stp1* Mutanten induzieren eine Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ..... 31

2.4.3 *stp1* Mutanten induzieren einen Apoptose-ähnlichem Zelltod ..... 32

2.4.4 Transkriptomanalysen von mit SG200 $\Delta$ stp1 infizierten Maispflanzen ..... 33

**2.5 Regulation von *stp1* während des Lebenszyklus von *U. maydis* ..... 41**

2.5.1 Expressionsanalyse von *stp1* mit Hilfe eines Reporterstammes ..... 41

2.5.2 Expressionsanalyse von *stp1* mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR ..... 42

2.5.3 Auswirkungen der Expression von *stp1* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors ..... 43

**2.6 Rekombinante Synthese von Stp1 und Gewinnung polyklonaler Antikörper ..... 45**

**2.7 Verifizierung der Sekretion von Stp1 nach konstitutiver Expression in *U. maydis* ... 48**

2.7.1 Analyse der Stp1 Sekretion in Sporidien ..... 48

2.7.2 Analyse der Stp1 Sekretion in b-abhängigen Filamenten ..... 50

2.7.3 Untersuchungen zur post-translationalen Modifikation von Stp1 ..... 52

**2.8 Untersuchungen zur Domänenstruktur von Stp1 ..... 53**

**2.9 Studien zur Lokalisierung von Stp1 in infizierten Maispflanzen ..... 55**

2.9.1	Lokalisierung von fluoreszenzmarkiertem Stp1 durch konfokale Mikroskopie .....	55
2.9.2	Immundetektion von Stp1 in Proteinextrakten infizierter Pflanzen .....	58
2.9.2	Immuncytochemische <i>in situ</i> Lokalisierung von Stp1-HA .....	59
2.9.3	Plasmolyse-Experimente zur Detektion von Stp1 im Apoplasten .....	61
2.9.4	FLP-vermittelter Nachweis der Translokation von Effektorproteinen .....	63
<b>2.10</b>	<b>Transiente Expression, Sekretion und Re-Import-Versuche von Stp1 in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>2.11</b>	<b>Identifizierung von Interaktionspartnern .....</b>	<b>68</b>
2.11.1	Identifizierung von Stp1 Interaktionspartnern über Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse .....	68
2.11.2	Co-Expression von Stp1 $\Delta$ N und pflanzlichen Interaktionspartnern in <i>N. benthamiana</i> ...	70
2.11.3	Identifizierung von Sip12- und Sip29-Interaktionsdomänen in Stp1 .....	72
2.11.4	Stp1 Selbstinteraktion in <i>S. cerevisiae</i> .....	73
<b>2.12</b>	<b>Effekte von Stp1 auf Bax-induzierten Zelltod in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Rolle des Clusters 5B für die biotrophe Entwicklung von <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2</b>	<b>Stp1 – ein in Brandpilzen konservierter Virulenzfaktor? .....</b>	<b>77</b>
<b>3.3</b>	<b>Stp1 ist essentiell für die Proliferation von <i>U. maydis</i> in der Pflanze .....</b>	<b>78</b>
<b>3.4</b>	<b>SG200<math>\Delta</math>stp1 Mutanten können keine kompatible Interaktion mit <i>Z. mays</i> etablieren .....</b>	<b>79</b>
<b>3.5</b>	<b>Die N- und C-Termini von Stp1 sind essentiell für die Proteinfunktion .....</b>	<b>84</b>
<b>3.6</b>	<b>Pilzhyphe sekretieren Stp1 als N-glycosyliertes Protein .....</b>	<b>86</b>
<b>3.7</b>	<b>Während der biotrophen Phase wird Stp1 in die apoplastische Interaktionszone sekretiert.....</b>	<b>88</b>
<b>3.8</b>	<b>Stp1 interagiert mit intrazellulären Maisproteinen .....</b>	<b>91</b>
<b>3.9</b>	<b>Stp1, ein Kandidat für einen translozierten <i>U. maydis</i>-Effektor? .....</b>	<b>93</b>
<b>3.10</b>	<b>Mögliche Funktionen von Stp1: Suppression von Zelltod? .....</b>	<b>94</b>
<b>3.11</b>	<b>Perspektiven .....</b>	<b>96</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>98</b>
<b>4.1</b>	<b>Material und Bezugsquellen .....</b>	<b>98</b>
4.1.1	Chemikalien .....	98
4.1.2	Puffer und Lösungen .....	98
<b>4.2</b>	<b>Zellkultivierung .....</b>	<b>98</b>
4.2.1	<i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	98
4.2.2	<i>U. maydis</i> .....	99
4.2.3	<i>S. cerevisiae</i> .....	100
4.2.4	<i>P. pastoris</i> .....	101
4.2.5	Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen .....	101
<b>4.3</b>	<b>Stämme, Oligonukleotide und Vektoren .....</b>	<b>101</b>
4.3.1	<i>E. coli</i> Stämme .....	101
4.3.2	<i>A. tumefaciens</i> Stämme .....	102
4.3.3	<i>U. maydis</i> Stämme .....	102
4.3.4	<i>S. cerevisiae</i> Stämme .....	104
4.3.5	<i>P. pastoris</i> Stämme .....	105
4.3.6	Oligonukleotide .....	105
4.3.7	Vektoren .....	109
<b>4.4</b>	<b>Mikrobiologische Standardmethoden .....</b>	<b>114</b>
4.4.1	<i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	114
4.4.2	<i>U. maydis</i> , <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. pastoris</i> .....	115

<b>4.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>116</b>
4.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	116
4.5.2	<i>In vitro</i> -Modifikation von Nukleinsäuren .....	117
4.5.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	118
4.5.4	Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	118
4.5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	118
4.5.6	Ortsspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren .....	119
4.5.7	Sequenzierung von Nukleinsäuren .....	119
4.5.8	Analyse von gDNA-Modifikationen mittels Southern Blot .....	120
4.5.9	Isolation von RNA .....	121
4.5.10	Quantitative Real-Time PCR .....	121
<b>4.6</b>	<b>Mais-Transkriptomanalysen durch Affymetrix-Microarrays</b> .....	<b>122</b>
<b>4.7</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>122</b>
4.7.1	Antikörper .....	122
4.7.2	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>U. maydis</i> .....	123
4.7.3	Proteinisolation aus <i>U. maydis</i> Kulturüberständen .....	124
4.7.4	Induktion von filamentösem Wachstum in AB33 .....	124
4.7.5	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> .....	124
4.7.6	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>Z. mays</i> .....	125
4.7.7	Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>N. benthamiana</i> .....	125
4.7.8	Trichloroacetat-Präzipitation von Proteinen .....	125
4.7.9	Immunpräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe .....	125
4.7.10	Deglykosylierung von Proteinen .....	126
4.7.11	Proteinbestimmung nach Bradford .....	126
4.7.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	126
4.7.13	Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Westernblot) .....	127
4.7.14	Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen und auf PVDF-Membranen .....	128
4.7.15	Heterologe Expression von Stp1ΔN in <i>E. coli</i> .....	128
4.7.16	Denaturierende Reinigung von Stp1ΔN aus <i>E. coli</i> .....	128
4.7.18	Heterologe Expression von Stp1ΔN in <i>P. pastoris</i> .....	129
4.7.19	Massenspektrometrische Analysen .....	129
<b>4.8</b>	<b>Analyse von Proteininteraktionen mit dem Hefe-Zwei-Hybridsystem</b> .....	<b>129</b>
<b>4.9</b>	<b>Analyse zur Inhibition von Bax-induziertem Zelltod</b> .....	<b>129</b>
<b>4.10</b>	<b>Pflanzenmethoden</b> .....	<b>130</b>
4.10.1	<i>Z. mays</i> .....	130
4.10.2	Tabak .....	131
<b>4.11</b>	<b>Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in fixiertem Pflanzengewebe</b> .....	<b>131</b>
<b>4.12</b>	<b>Färbungen, Mikroskopie und Bildverarbeitung</b> .....	<b>131</b>
4.11.1	Färbung mit Chlorazol Black E .....	131
4.11.2	Färbung mit Calcofluor White .....	132
4.11.3	Färbung mit WGA-AF488 und Propidium-Iodid .....	132
4.11.4	Färbung von Membranen mit FM4-64 .....	132
4.11.5	Diaminobenzidinfärbung .....	133
4.11.6	Plasmolyse von infiziertem Pflanzenmaterial .....	133
4.11.7	Histochemischer Nachweis von GUS-Aktivität .....	133
4.11.8	Mikroskopie und Bildverarbeitung .....	133
<b>4.13</b>	<b>Bioinformatische Analysen</b> .....	<b>134</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>135</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Der Maisbranderreger *Ustilago maydis*

*U. maydis* ist ein phytopathogener Brandpilz, der die weltweit verbreitete Pflanzenkrankheit Maisbeulenbrand verursacht. Der Heterobasidiomycet gehört zur Ordnung der *Ustilaginales*, die etwa 1100 Spezies umfasst und zu denen auch die phytopathogenen Brandpilze zählen. Diese befallen mit Gräsern und Getreiden wichtige Nutzpflanzen und verursachen durch Ertragseinbußen teilweise erheblichen wirtschaftlichen Schaden (Weise, 1987; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). Ursprünglich wurden Brandpilze auf Grund ihrer landwirtschaftlichen Relevanz untersucht. Vertreter der Gattung *Ustilago*, *Tilletia* und *Sporisorium* sind dabei für die signifikantesten Ertragsverluste verantwortlich. So verursachen *Ustilago*-Arten den Flugbrand bei Hafer (*U. avenae*), Gerste (*U. nuda*) und Weizen (*U. tritici*), den Hartbrand bei Gerste und Hafer (*U. hordei*) und den Mais- und Zuckerrohrbrand (*U. maydis* und *U. scitaminea*). Nutzpflanzenschädigende *Tilletia*-Vertreter sind u. a. *T. caries* und *T. foetida* als Auslöser der Weizensteinbrände sowie *T. contraversa* als Verursacher des Zwergsteinbrandes. In der Gattung *Sporisorium* findet man sowohl die Erreger des Zuckerrohrbrandes als auch des Kopfbrandes in Zuckerrohr und Mais (Agrios, 1988). In den letzten 25 Jahren hat sich *U. maydis* zu einem Modellorganismus für phytopathogene Brandpilze entwickelt (Kahmann *et al.*, 2000; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Steinberg und Perez-Martin, 2008).



**Abb. 1:** Tumorbildung in einer weiblichen Maisblüte durch Infektion mit *U. maydis*. Photo: D. Schipper.

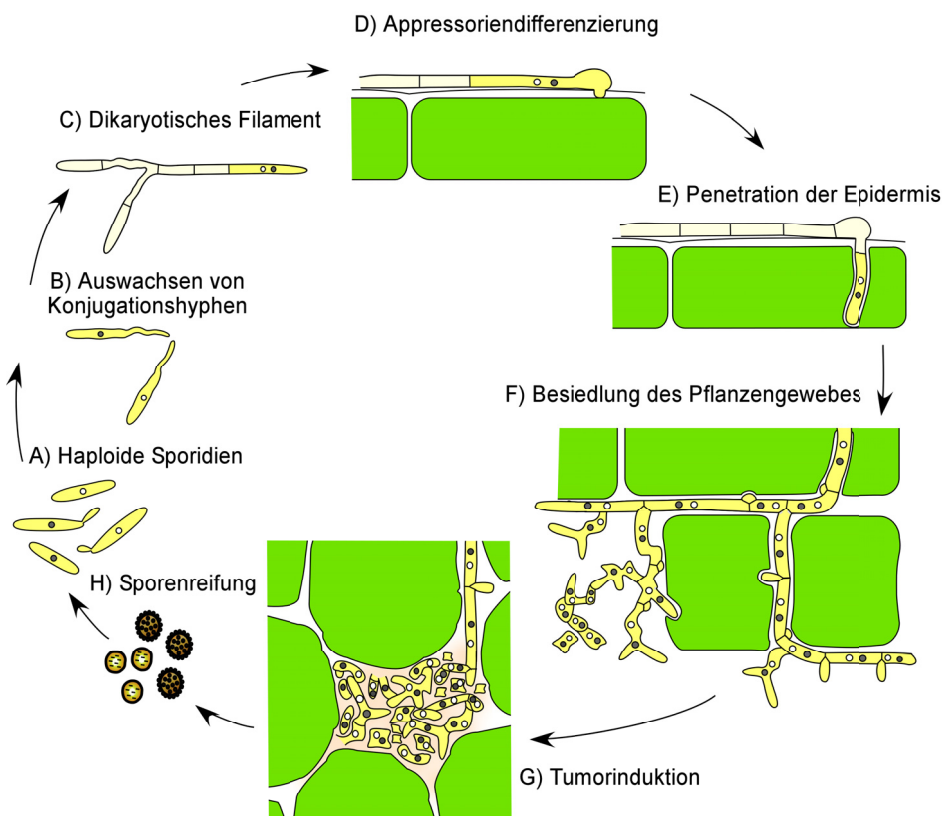
*U. maydis* ist während seiner pathogenen Entwicklung auf lebendes Pflanzenmaterial angewiesen. Deshalb zählt der Basidiomycet zu den biotrophen Pilzen. Dieses steht im Gegensatz zu nekrotrophen Pflanzenpathogenen, wie etwa *Fusarium*- oder *Botrytis*-Spezies, welche befallene Pflanzenzellen zunächst abtöten, um dann auf dem abgestorbenen Material zu wachsen. *U. maydis* besitzt ein sehr enges Wirtsspektrum und infiziert neben Mais (*Zea mays*) lediglich Teosinte (*Zea mays ssp. Mexicana* und *ssp. pavigluminis*), die wahrscheinliche Urform von Mais (Doebley, 1992). *U. maydis* ist in allen Regionen verbreitet in denen Mais angebaut wird. Eine Ausnahme bilden lediglich Australien und Neuseeland (Ainsworth, 1965).

*U. maydis* Infektionen verursachen zunächst eine leichte Chlorose- und Anthozyanbildung.

Später können an allen oberirdischen Pflanzenteilen gallenartige Strukturen gebildet werden, die als Tumore bezeichnet werden (Christensen, 1963). Beim Feldanbau von Mais dominieren vor allem Tumore im Maiskolben (Abb. 1). Individuelle Maiskörner werden dabei komplett durch das Tumormaterial ersetzt. In reifen Tumoren werden große Mengen von Teliosporen gebildet, deren schwarze Farbe und Struktur an Ruß erinnert und dem Pilz den Namen Maisbeulenbrand verliehen hat.

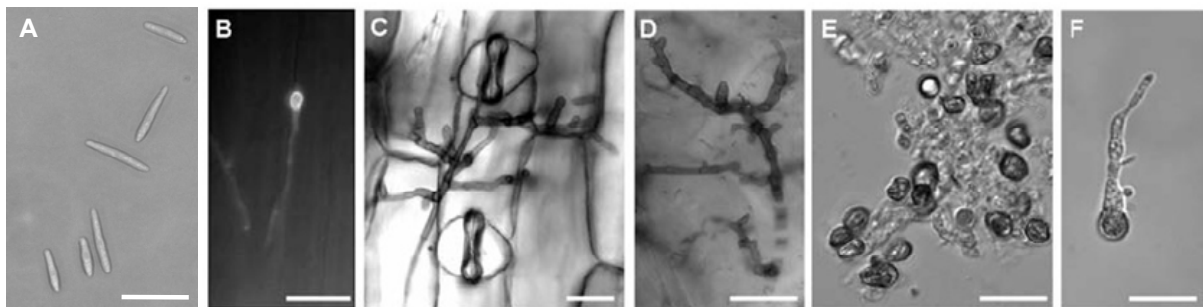
## 1.2 Das *Ustilago maydis* / *Zea mays* Pathosystem

Der Lebenszyklus von *U. maydis* ist eng mit dem seiner Wirtspflanze Mais verknüpft (Abb. 2). Zwar kann sich der Pilz saprophytisch als einzellige haploide Sporidie durch Knospung vermehren, für die sexuelle Vermehrung jedoch ist der Weg über die Pflanze unumgänglich. Daher unterscheidet man bei *U. maydis* zwischen einer saprophytischen und einer biotrophen Wachstumsphase (diphasischer Lebenszyklus).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des diphasischen Lebenszyklus von *U. maydis* in Abhängigkeit von der Wirtspflanze *Z. mays*.** Der Lebenszyklus lässt sich in ein saprophytisches (A-C) und ein biotrophes Stadium (D-H) unterteilen. Während der saprophytischen Phase wächst *U. maydis* Hefe-ähnlich durch Knospung. Nach der Paarung kompatibler Sporidien bildet sich ein dikaryotisches Filament, das die Pflanze mit Hilfe eines Appressoriums penetriert. Die Hyphen wachsen fortan intra- und interzellulär ohne die Wirtszellen zu beschädigen. Schließlich bildet der Pilz Aggregate im Apoplasten des Pflanzengewebes. In diesem Stadium erfolgt die Karyogamie, die Hyphenfragmentierung und es entwickeln sich die diploiden Sporen. Reife Sporen werden nach Aufplatzen des Gewebes freigesetzt. Unter geeigneten Bedingungen können sie auskeimen, die Meiose durchlaufen und haploide Sporidien bilden. Abb. verändert nach Kämper *et al.* (2006) u. Doehlemann *et al.* (2008b).

Treffen zwei haploide Sporidien (Abb. 2A/3A) unterschiedlichen Paarungstyps auf der Maisblattoberfläche zusammen, können sie sich über ein Pheromon-Rezeptor-System gegenseitig wahrnehmen. Dieses wird durch den bi-allelischen Kreuzungstyplokus *a* kodiert, der für die Zell-Zell-Erkennung haploider Sporidien und deren anschließende Fusion verantwortlich ist. Die Pheromonperzeption führt zur Bildung unseptierter Konjugationshyphen (Abb. 2B; Bowman, 1946; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar, 1993, Spellig *et al.*, 1994), die wahrscheinlich anhand des Pheromongradienten polar aufeinander zuwachsen und an ihren apikalen Spitzen fusionieren. Es entsteht ein dikaryotisches Filament (Abb. 2C; Sleumer, 1932; Rowell, 1955; Snetselaar, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996). Stabiles filamentöses Wachstum sowie die anschließende pathogene Entwicklung sind abhängig von einem zweiten, multi-allelischen Kreuzungstyplokus, dem *b*-Lokus. Dieser kodiert für zwei Homeodomänen-Proteine, die bEast (bE) und bWest (bW) genannt werden. Nur wenn die bE- und bW-Proteine von unterschiedlichen Allelen kodiert werden, bilden sie ein aktives Heterodimer, welches als Transkriptionsfaktor den zentralen Regulator der Pathogenitätsgene darstellt (Banuett und Herskowitz, 1989; Kämper *et al.*, 1995; Brachmann *et al.*, 2001).



**Abb. 3: Mikroskopische Analyse verschiedener Stadien des Lebenszyklus von *U. maydis*.** **A:** Saprophytisch wachsende Sporidien. **B:** Calcofluor White-Färbung eines dikaryotischen Filaments mit Appressorium auf der Blattoberfläche. **C:** Chlorazol Black E-Färbung intrazellulär wachsender Hyphen. **D:** Chlorazol Black E-Färbung interzellulär wachsender Hyphen. **E:** Sporenreifung. **F:** Zum Promycelium auskeimende Spore. Die Bilder **A** und **C-F** wurden mittels DIC-Mikroskopie aufgenommen. Bild **B** wurde mit dem EPI-Fluoreszenzmikroskop erstellt. Teile der Abb. wurden freundlicherweise von K. Heidrich zur Verfügung gestellt. Der Größenstandard entspricht 20 µm.

Nach der Zellfusion wächst das filamentöse Dikaryon unter Einzug von Septen auf der Cuticula der Pflanze weiter. Lediglich das apikale Hyphensegment ist dabei mit Cytoplasma gefüllt; ältere Hyphenbereiche bestehen aus leeren Segmenten (Abb. 2C; Brefeld, 1883; Christensen, 1963; Steinberg *et al.*, 1998). Etwa 14 bis 16 Stunden nach Infektion wird schließlich auf der Blattoberfläche an der Hyphenspitze eine leicht geschwollene Penetrationsstruktur, das sogenannte Appressorium, ausgebildet (Abb. 2D/3B; Snetselaar und Mims, 1992).

Die Signale, die den Zeitpunkt und Ort der Appressorienbildung auf der Blattoberfläche auslösen, sind bisher unbekannt. Mendoza-Mendoza *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Ausbildung von septierten Filamenten, die morphologisch denen auf der Blattoberfläche entsprechen, und die Differenzierung von Appressorien *in vitro* eines hydrophoben Stimulus bedürfen. Ein zusätzlicher chemischer Reiz durch Cutin-Monomere (Hydroxy- und Epoxy-C<sup>16</sup> oder -C<sup>18</sup> Fettsäuren) hat dabei einen stimulierenden Effekt. Epicuticuläre Wachse, ebenfalls Bestandteil der Cuticula, scheinen dagegen für die Filament- und Appressorienbildung keine Rolle zu spielen (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu anderen Pilzen, wie beispielsweise *Magnaporthe grisea*, weisen Appressorien in *U. maydis* keine verdickte, stark melanisierte Zellwand auf (Mendgen und Deising, 1993, Snetselaar und Mims, 1993; Brachmann *et al.*, 2003). Die Melanisierung dient der Verstärkung der pilzlichen Zellwand und ist Voraussetzung für den Aufbau eines hohen Turgors, der eine mechanische Penetration der Blattoberfläche erlaubt (Howard *et al.*, 1991; Money und Howard, 1996). Die Penetration der Pflanzenzellwand durch *U. maydis* wird wahrscheinlich durch ein begrenztes Arsenal sekretierter lytischer Enzyme bewerkstelligt, die für eine lokale partielle Degradation bzw. Flexibilisierung der Pflanzenzellwand sorgen, so dass ein Durchwachsen der ansonsten rigiden Barriere aus mit Glukanen quervernetzter Cellulose ermöglicht wird (Carpita *et al.*, 2001; Abedon *et al.*, 2006; Kämper *et al.*, 2006; Doehlemann *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008).

Maisepidermiszellen werden von *U. maydis* entweder direkt (Abb. 2D) oder nach subkutikulärem Wachstum in die antiklinale Zellwand penetriert (Snetselaar und Mims, 1992). Nur juvenile Pflanzenzellen können von *U. maydis* infiziert werden (Brefeld, 1895; Christensen, 1963). Nach Penetration der pflanzlichen Zellwand wachsen *U. maydis* Hyphen zunächst intrazellulär in der Maisepidermis, wobei die Cytoplasmamembran der Wirtszelle invaginiert wird und die Pilzhyphen schlauchartig umgibt (Abb. 2E/3C; Snetselaar und Mims, 1993; Doehlemann *et al.*, 2009). Zwischen der Pilzhyphe und der Cytoplasmamembran der Pflanze entsteht eine apoplastische Zone, die für eine erfolgreiche biotrophe Interaktion eine entscheidende Rolle spielt (Bauer *et al.*, 1997). Bereits 24 Stunden nach einer *U. maydis* Infektion kann eine starke Besiedlung der Blattepidermis durch intrazellulär wachsende Hyphen festgestellt werden (Abb. 2F). Nach der initialen intrazellulären Kolonisierung der Epidermis dringen die Pilzhyphen in das Blattmesophyll und die Leitbündel ein. Dabei kann man die Bildung sogenannter Schnallen beobachten, welche die koordinierte Kernteilung des dikaryotischen Myzels ermöglichen (Abb. 2F; Snetselaar und Mims, 1994; Banuett und Herskowitz, 1996; Scherer *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu anderen biotrophen Pathogenen, wie dem Echten Mehltau (*Erysiphaceae*) und dikaryotischen Rostpilzen, entwickelt *U. maydis* keine „feeding structures“ (Haustorien; Mendgen und Hahn, 2002), d. h. die Versorgung mit Nährstoffen muss über die apoplastische Interaktionszone erfolgen. Vermutet wird, dass Verzweigungen von interzellulär wachsenden Hyphen, die häufig fingerartig in benachbarte Zellen einwachsen, Haustorien-ähnliche Funktionen erfüllen könnten (Snetselaar und Mims, 1994). Biochemisch konnte durch Messung freier Hexosen und Saccharose gezeigt werden, dass zwischen vier und sechs Tagen nach Infektion die befallenen Blattbereiche vom „Source“- zum „Sink“-Gewebe umprogrammiert werden (Billett und Burnett, 1978; Horst *et al.*, 2008; Doehlemann *et al.*, 2008b). Zu diesem Zeitpunkt durchlaufen juvenile Maisblätter eine Transition vom C<sub>3</sub>- zum C<sub>4</sub>-Metabolismus. In infizierten Pflanzen unterbleibt dieses (Horst *et al.*, 2008, Doehlemann *et al.*, 2008b). Verfügbare freie Hexosen können über Zuckertransporter aufgenommen und verstoffwechselt werden (Hahn und Mendgen, 2001; Horst *et al.*, 2008). *U. maydis* ist mit 19 Zuckertransportern ausgestattet. Zwei dieser Transporter, ein genereller Hexose- sowie ein neuartiger Saccharosetransporter, werden für die pathogene Entwicklung benötigt (R. Wahl und J. Kämper, pers. Mitteilung). Zusätzlich könnte die im Apoplasten vorhandene Saccharose mittels pilzlicher Invertase gespalten werden (Horst *et al.*, 2008).

Die Tumorinduktion beginnt unter Laborbedingungen etwa vier Tage nach Infektion und ist durch eine verstärkte Verzweigung und starke Proliferation der Pilzhyphen im Apoplasten gekennzeichnet (Abb. 2F/3D; Snetselaar und Mims, 1994, Doehlemann *et al.*, 2007). Außerdem findet man abgerundete, lappenartige Strukturen an den Hyphenspitzen (Banuett und Herskowitz, 1996). Im Verlauf von sechs bis zwölf Tagen bilden sich große Pilzaggregate in zellfreien Bereichen des Mesophyllgewebes (Doehlemann *et al.*, 2008a). Die Tumorbildung geht mit einer Vergrößerung der Pflanzenzellen sowie mitotischen Teilungen einher, die vermutlich durch Eingriffe in den Phytohormonhaushalt der Pflanze durch *U. maydis* induziert werden (Kämper *et al.*, 2006; Reineke *et al.*, 2008; Doehlemann *et al.*, 2008b).

Im Tumorgewebe erfolgt die Karyogamie, die Pilzhyphen fragmentieren, runden sich ab und differenzieren zu diploiden Teliosporen (Snetselaar und Mims, 1994; Banuett, 1995; Banuett und Herskowitz, 1996; Kahmann *et al.*, 2000). Diese sind in eine gelatinöse Matrix eingebettet (Abb. 2G/3E). Die Sporen werden nach Freisetzung durch Wind, Regen und Tiere verbreitet. In geeigneter, feuchter Umgebung wird in den Sporen die Meiose induziert und es entstehen haploide Sporidien, so dass der Lebenszyklus geschlossen wird (Abb. 3F; Christensen, 1963; Kahmann *et al.*, 2000).



### 1.3 *U. maydis* als Modellorganismus für phytopathogene Pilze

*U. maydis* gehört zu den am besten charakterisierten pflanzenpathogenen Pilzen und eignet sich aufgrund seiner genetischen Zugänglichkeit hervorragend als Modellorganismus. Eine herausragende Eigenschaft, die diesen Pilz gegenüber obligat biotrophen Pilzen bevorteilt, ist seine Kultivierbarkeit in axenischer Kultur sowie auf Festmedien. Zudem kann *U. maydis* mithilfe verschiedener dominanter Selektionsmarker effizient transformiert werden – eine Technik, die bei anderen Brand- und Rostpilzen noch Probleme bereitet (Banuett, 1995; Kämper, 2004; Ellis *et al.*, 2007). Es existieren integrative und selbstreplizierende Plasmide (Tsukuda *et al.*, 1988) sowie verschiedene gut charakterisierte konstitutive und induzierbare Promotoren (Spellig *et al.*, 1996; Brachmann, 2001; Zarnack *et al.*, 2006). Desweiteren steht eine Vielzahl etablierter molekularbiologischer Methoden zur Verfügung, welche die Verwendung von DNA-Mikroarrays für Transkriptomanalysen einschließt (Vraneš, 2006; Kämper *et al.*, 2006).

Die vollständige Entschlüsselung der Genomsequenz von *U. maydis* durch das Broad Institute und Bayer Crop Science ([http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/)) sowie die Annotation und übersichtliche Präsentation durch MIPS (MUMDB: MIPS *Ustilago maydis* DataBase; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) erleichtern bioinformatische Analysen für revers genetische Ansätze (Kämper *et al.*, 2006). Zudem stehen neuerdings auch die Genomsequenzen von den nahe verwandten Brandpilzen *S. reilianum* und *U. hordei* zur Verfügung, was den Vergleich der Genome sowie die Untersuchung von Genen bezüglich ihrer Diversität möglich macht. Durch vergleichende Genomanalysen können möglicherweise interessante Kandidatengene identifiziert werden, die für Unterschiede in der biotrophen Entwicklung verantwortlich sind bzw. die Grundlagen für die Wirtsspezifität der Brandpilze bilden (J. Schirawski und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

Die Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche kann mittlerweile mithilfe eines *in vitro* Systems bis hin zur Appressorienbildung nachgestellt werden. Letztere können durch die Verwendung eines Markergens, welches ausschließlich in apikalen Zellen, die Appressorien ausdifferenzieren, exprimiert wird, leicht identifiziert werden (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Auch die Filamentbildung kann *in vitro* mittels Aktivkohle-haltiger Festmedien simuliert werden (Day und Anagnostakis, 1971; Banuett und Herskowitz, 1994).

Ein wichtiger Vorteil für Pathogenitäts-relevante Fragestellungen ist der relativ kurze Infektionszyklus von *U. maydis*, welcher unter künstlichen Bedingungen im Gewächshaus in drei Wochen vollständig durchlaufen werden kann (Banuett, 1995). Im Gegensatz zu Infektionen mit anderen Brandpilzen treten Symptome nicht erst in der Blüte auf, sondern

sind in jungen Pflanzen bereits sieben Tage nach Infektion erkennbar (Kahmann *et al.*, 2000). Für die Untersuchung von Deletionsmutanten stehen außerdem zwei haploide sogenannte solopathogene *U. maydis* Stämme zur Verfügung. Bei dem Stamm CL13 (Bölker *et al.*, 1995) handelt es sich um ein Derivat des haploiden Wildtypstammes FB1 (Kreuzungstypgene *al b1*; Banuett und Herskowitz, 1989). CL13 verfügt über kompatible *bE/bW* Gene, deren Genprodukte auf der Pflanzenoberfläche ein aktives b-Heterodimer bilden können (*al bE1 bW2*). So kann dieser Stamm trotz fehlendem kompatiblen Pheromon/Rezeptor-System Maispflanzen infizieren und die pathogene Entwicklung durchlaufen. Im Vergleich zu Infektionen mit kompatiblen Wildtypstämmen sind die Symptome jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Es kommt nur selten zu größeren Tumoren und Sporenbildung kann nicht beobachtet werden. Der zweite solopathogene Stamm SG200 (Kämper *et al.*, 2006) wird als Standardstamm zur Generierung von Mutanten verwendet, wenn untersucht werden soll, ob die entsprechenden Gene einen Einfluss auf die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* haben. SG200 besitzt sowohl ein aktives *bE/bW*-Heterodimer als auch ein aktives Pheromon/Rezeptor-System (*al mfa2 bE1 bW2*). Dieser Stamm zeigt, vergleichbar mit Kreuzungen kompatibler Stämme, filamentöses Wachstum auf Aktivkohlemedium und induziert effiziente Tumorbildung in infizierten Maispflanzen. Im Vergleich zu Kreuzungen kompatibler Wildtypstämmen ist die Virulenz nur leicht reduziert und auch Sporenbildung kann beobachtet werden (Kämper *et al.*, 2006). Durch die Verfügbarkeit dieser zwei solopathogenen Stämme entfällt die Notwendigkeit, Mutationen in jeweils zwei kompatiblen Stämmen zu generieren.

#### **1.4 Die Rolle sekretierter Effektoren in biotrophen Interaktionen**

Wie alle biotrophen Pilze ist auch *U. maydis* davon abhängig, dass seine Wirtspflanze während der pathogenen Entwicklung überlebt und ihn mit Nährstoffen versorgt. Das erfolgreiche Umprogrammieren des Metabolismus der Pflanze zu Gunsten des Pathogens ist Voraussetzung für die Entwicklung einer kompatiblen biotrophen Interaktion (Dangl, 1995; Doehlemann *et al.*, 2008a).

Pflanzen besitzen ein vielschichtig aufgebautes Verteidigungssystem, das Pathogene erkennt und ihre Proliferation verhindert (Dangl und Jones, 2001; Nimchuk *et al.*, 2003; Chisholm *et al.*, 2006). In kompatiblen Interaktionen kann das Pathogen dieses System erfolgreich umgehen oder aktiv supprimieren. In inkompatiblen Interaktionen kann der Wirt die Besiedlung durch das Pathogen erfolgreich abwehren, indem er es rechtzeitig erkennt (Dangl, 1995; Staskawicz *et al.*, 1995).

Mit Hilfe eines basalen Immunsystems können Pflanzen konservierte Strukturen von Pathogenen, sogenannte MAMPS oder PAMPS („microbial-/pathogen-associated molecular patterns“), wie z. B. das Chitin von Pilzzellwänden oder das Flagellin von Bakterien, erkennen (Nürnberger und Brunner, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004; Kunze *et al.*, 2004; Zipfel und Felix, 2005). Dieses geschieht über PRR-Membranrezeptoren („pattern recognition receptors“), welche die Signale über MAP-Kinase-Kaskaden in das Zellinnere weiterleiten und so eine verstärkte Synthese von Pathogenitäts-assoziierten PR-Proteinen („pathogenesis-related proteins“) bewirken. Dies kann zu einer PAMP-vermittelten Resistenz der Pflanze führen, die mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxxygen species“), wie beispielsweise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und der Bildung von antimikrobiellen Substanzen assoziiert ist (Baker *et al.*, 1997; Jones und Dangl, 2006).

Spezifische Effektorproteine oder Virulenzfaktoren, die vom Pathogen sekretiert werden, dienen der Unterdrückung dieses basalen Immunsystems. Sie können beispielsweise dafür sorgen, dass die Pflanzenabwehr supprimiert wird. Erfolgreiche Pathogene können mithilfe sekretierter Effektoren das basale Immunsystem „überlisten“ („effector-triggered susceptibility“; Jones und Dangl, 2006). Im Verlauf der Evolution können von der Pflanze wiederum Resistenzproteine (R-Proteine) entwickelt werden, die diese, dann auch als Avirulenzfaktoren (Avr-Proteine) bezeichneten, sekretierten Effektoren spezifisch erkennen und hierüber ein sekundäres Immunsystem aktivieren (Keen, 1990; Van der Biezen und Jones, 1998). Dadurch kann es zu einer Effektor-vermittelten Resistenz kommen (Jones und Dangl, 2006). Die meisten pflanzlichen R-Proteine gehören der Klasse der NB-LRR-Proteine an, welche aus einer konservierten NB („nucleotide-binding“) und einer die Spezifität vermittelnden LRR-Domäne („leucine-rich repeat“) bestehen. Wird das Effektor-vermittelte Immunsystem durch ein spezifisches R-Protein induziert, so wird eine Kaskade von Abwehrmechanismen vonseiten der Wirtszelle in Gang gesetzt. Die induzierten Abwehrmechanismen gleichen dabei stark denen, die durch das basale Immunsystem angeregt werden. Sie werden jedoch im Gegensatz dazu stark amplifiziert und führen deshalb zur Resistenz der Pflanze gegenüber dem Pathogen (Jones und Dangl, 2006; Shen *et al.*, 2007). Die Effektor-vermittelte Abwehr ist assoziiert mit der Aktivierung eines Salicylat-abhängigen Signalweges, der zur Expression der bereits erwähnten Abwehr-assoziierten PR-Proteine sowie zur hypersensitiven Reaktion der Pflanze führt (Greenberg und Yao, 2004; Glazebrook, 2005; Jones und Dangl, 2006; O’Connel und Panstruga, 2006). Bei der hypersensitiven Reaktion beobachtet man eine vermehrte Produktion von ROS (Morel und Dangl, 1997; Health, 2000; Greenberg und Yao, 2004), die Synthese von phenolischen Substanzen und

Phytoalexinen sowie die Deposition von Callose und Lignin (Schulze-Lefert, 2004). Dies führt spezifisch an der Infektionsstelle zu einem lokalen programmierten Zelltod (hypersensitive Reaktion). Einhergehend damit wird das Pathogen von seinen Nährstoffquellen isoliert und durch die antimikrobiellen Substanzen abgetötet. Somit kommt es zu einer lokal begrenzten Nekrose und die Pflanze nimmt ansonsten keinerlei Schaden. Bei nekrotrophen Pathogenen ist dieses Prinzip jedoch nicht erfolgreich, da sie nicht auf lebendes, sondern auf totes Pflanzenmaterial angewiesen sind. Hier werden bei resistenten Pflanzen andere Wege, die von Jasmonat- und Ethylen-Signalwegen abhängig sind, zur Abwehr verwendet (Glazebrook, 2005).

Im Verlauf der Co-Evolution von Pflanzen und ihren biotrophen Pathogenen kommt es zu einem Wettstreit um die besten Waffen („arms race“; Birch *et al.*, 2006), was dazu führt, dass sowohl Effektoren wie auch R-Proteine einem starken diversifizierenden Selektionsdruck unterliegen. Mittels vergleichender Genomanalysen nah verwandter Arten können Kandidaten pilzlicher Effektoren anhand dieser unterdurchschnittlichen Aminosäure-Konservierung identifiziert werden (Dodds *et al.*, 2006). Avirulenzgene können durch Mutationen, die durch den hohen Selektionsdruck favorisiert werden, neue Funktionen erlangen. Damit können sie der Erkennung durch das zugehörige R-Protein entgehen und dem Pathogen wiederum eine kompatible Interaktion ermöglichen. Das „Zigzag“-Modell von Jones und Dangl (2006) beschreibt diesen Zusammenhang zwischen den „Patterns“ (MAMPS/PAMPS) sowie den Effektoren von Pathogenen im Wettstreit mit der Evolution der R-Gene im pflanzlichen Immunsystem.

Nur in wenigen Fällen konnte bisher eine durch die Gen-für-Gen-Hypothese beschriebene direkte Interaktion von Avirulenzproteinen und den zugehörigen spezifischen R-Proteinen experimentell bestätigt werden (Baker *et al.*, 1997; Van der Biezen und Jones, 1998; Tang *et al.*, 1996; Jia *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 2006). Vielmehr scheinen die meisten R-Proteine den zugehörigen Effektor indirekt zu erkennen, indem sie die Zielproteine der Effektoren „bewachen“ oder Effektor-generierte enzymatische Produkte detektieren („Guard“/Wächter-Hypothese; Van der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001; Leister und Katagiri, 2000; Shao *et al.*, 2003). Diese Zielproteine sind daher wiederum einem sehr hohen Selektionsdruck unterworfen. Deshalb gehen neueste Theorien davon aus, dass die Pflanze im Verlauf der Evolution neben den eigentlichen Zielproteinen zusätzliche Kopien entwickelt hat, welche die wirklichen, für die Pflanze essentiellen Zielproteine maskieren („Decoy“/Köder-Hypothese; Van der Hoorn und Kamoun, 2008).

Sekretierte Effektoren können entweder im Apoplasten wirken oder in die Pflanzenzelle transloziert werden (Kamoun, 2006; Kamoun, 2007). Apoplastische Effektorproteine werden direkt in den Interaktionsraum zwischen Pilzhyphe und dem pflanzlichen Symplasten sekretiert. Dort können sie mit apoplastischen Pflanzenproteinen oder in der Cytoplasmamembran lokalisierenden Rezeptoren interagieren. Sie können beispielsweise als Inhibitoren pflanzlicher Proteasen fungieren oder bei der Detoxifizierung von ROS mitwirken. In Oomyceten, wie *Phytophthora infestans*, wurden apoplastische Proteaseinhibitoren identifiziert, die das Pathogen vor Glukanasen und anderen Proteasen des Wirtes schützen (Tian *et al.*, 2004). Auch *Cladosporium fulvum*, ein biotropher Pilz, sekretiert Effektoren, die Cysteinproteasen der Wirtspflanze Reis inhibieren (Tian *et al.*, 2007; Bolton *et al.* 2008). Zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxifizierung wird von *U. maydis* eine Häm-Peroxidase abgegeben, die für die Virulenz essentiell ist und wahrscheinlich den Pilz vor den PAMP-vermittelten Abwehrreaktionen durch ROS schützt (Molina und Kahmann, 2007).

In phytopathogenen Oomyceten sowie extrazellulären Bakterien gibt es viele Beispiele für sekretierte Effektoren, die in die Wirtszelle transloziert werden. So wurde in sekretierten Oomyceten-Effektoren das sogenannte RXLR-EER-Aminosäuremotiv identifiziert, welches für einen Transfer der Proteine in die Wirtszelle essentiell und hinreichend ist (Kamoun, 2007; Morgan und Kamoun, 2007; Whisson *et al.*, 2007; Dou *et al.*, 2008). Weiterhin wurde für die Translokation von Proteinen mit RXLR-EER-Motiven gezeigt, dass es keiner Pathogenmaschinerie für die Translokation über die Cytoplasmamembran bedarf (Catanzariti *et al.*, 2006; Dou *et al.*, 2008). Translozierte Oomycetenproteine interagieren mit cytoplasmatischen Pflanzenproteinen oder interferieren mit der Genregulation im Nukleus (Kamoun, 2006). Das RXLR-EER-Motiv ist in leicht abgewandelter Form (PEXEL/VTF) auch im Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* vorhanden und dient dort der Translokation von Effektorproteinen von der parasitären Vakuole in das Erythrozytencytoplasma (Hiller *et al.*, 2004; Marti *et al.*, 2004), wodurch eine Spezies-übergreifende Konservierung vorliegt (Bhattacharjee *et al.*, 2006; Halder *et al.*, 2006). Bhattacharjee und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass neben der strukturellen Ähnlichkeit auch funktionelle Austauschbarkeit vorliegt, indem ein *Plasmodium*-Translokationsmotiv durch ein Oomycetenmotiv funktionell ersetzt werden konnte. Im annotierten Proteom von *U. maydis* jedoch konnte dieses Motiv nicht identifiziert werden (Mueller *et al.*, 2008).

Phytopathogene extrazelluläre Bakterien können mit Hilfe des Typ III- und Typ IV-Sekretionssystems Proteine aktiv in Pflanzenzellen einschleusen. In Gram-negativen Bakterien wie *Ralstonia* oder *Xanthomonas sp.* dient das Typ III-System zur direkten

Injektion von Effektoren in das Cytoplasma der Wirtszellen (Lahaye und Bonas, 2001; Axtell *et al.*, 2003; Gosh, 2004; Büttner und Bonas, 2006). *Agrobacterium tumefaciens* dagegen transportiert Nukleoproteinkomplexe über das Typ IV-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle. Diese enthalten sogenannte T-DNA, die in das Wirtsgenom eingebaut wird. Die T-DNA kodiert für Virulenzfaktoren, die dem Pathogen die Besiedlung des Wirtes ermöglichen (Backert und Meyer, 2006). Ähnliche Systeme sind in phytopathogenen Pilzen bislang nicht beschrieben.

Auch wenn für pilzliche Effektoren keine Translokationsmotive oder -maschinerien bekannt sind, gibt es hier dennoch Beispiele für sekretierte Proteine, die über unbekannte Mechanismen in das Innere von Pflanzenzellen gelangen können. Das Rtp1 Protein aus dem Ackerbohnenrost (*Uromyces fabae*) beispielsweise lokalisiert im Nukleus der Wirtspflanze *Vicia faba* (Kemen *et al.*, 2005). Auch für Avr-Pita aus *Magnaporthe grisea*, dem Reiserreger, konnte indirekt gezeigt werden, dass das Protein innerhalb der Wirtszelle wirkt, da es mit dem cytoplasmatischen R-Protein Pi-ta aus Reis interagiert (Jia *et al.*, 2000). Auf ähnlichem Wege wurde für das Avirulenzprotein AvrL567 aus *Melampsora lini* die Interaktion mit dem zugehörigen R-Protein und damit der Transfer bewiesen (Dodds *et al.*, 2004). Diese Beispiele zeigen, dass auch pilzliche Effektoren apoplastische oder cytoplasmatische Wirkungsweisen haben können.

### **1.5 Die Bedeutung sekretierter *U. maydis* Effektoren für die pathogene Entwicklung**

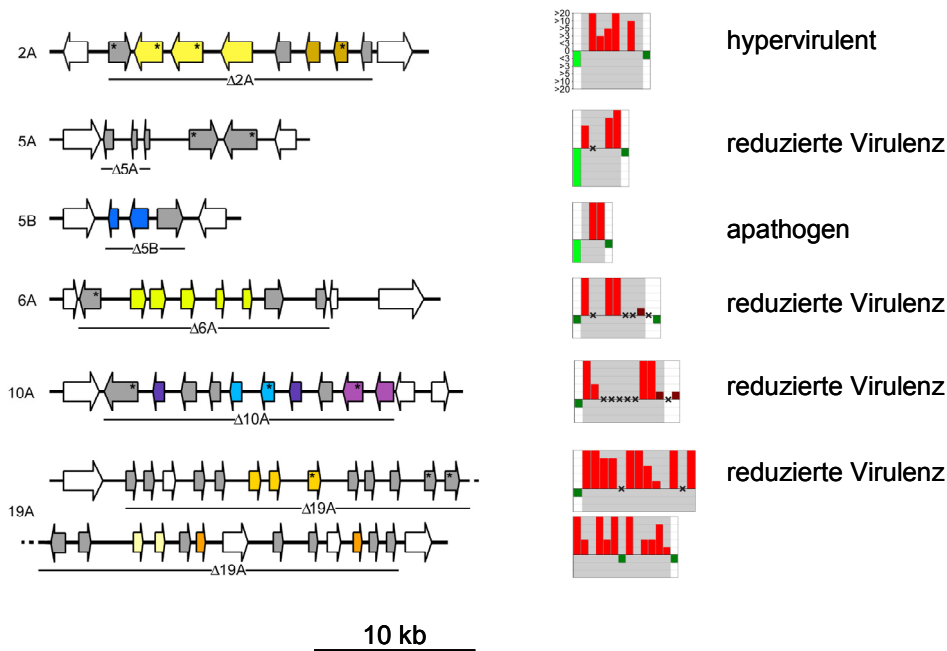
Für die Interaktion zwischen *U. maydis* und Mais wurde bislang keine QTL-vermittelte Resistenz beschrieben („quantitative trait locus“; Kahmann *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2007). Bei den im Labor verwendeten Maisvarietäten können nach *U. maydis* Infektion, außer der Anthozyanbildung und gelegentlichen Nekrosen, keine sichtbaren Abwehrreaktionen festgestellt werden (Snetselaar und Mims, 1994; Banuett und Herskowitz, 1996; Basse, 2005; Doehlemann *et al.*, 2008b). Neueste Ergebnisse sowie die Analyse der *U. maydis* Genomsequenz haben ergeben, dass der Pilz ein vielseitiges System entwickelt hat, mit der er die Abwehr der Pflanze weitgehend unschädlich machen kann. Neben einem effizienten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxifizierungssystem, das wahrscheinlich dem Schutz vor der durch die pilzlichen PAMPS ausgelösten ROS-Bildung dient, verwendet *U. maydis* dabei vor allem sekretierte Virulenzfaktoren (Kämper *et al.*, 2006; Molina und Kahmann, 2007; Doehlemann *et al.*, 2008b; Brefort *et al.*, 2008a; Brefort *et al.*, 2008b).

Kämper *et al.* (2006) identifizierten bioinformatisch durch Kombination der Programme SignalP und ProtCom innerhalb des annotierten Proteoms

(<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>; MUMDB release 300707) 426 *U. maydis* Proteine, die eine hohe Sekretionswahrscheinlichkeit besitzen. Dabei wurde ein Vorhandensein eines kanonischen N-terminalen Signalpeptids vorausgesetzt, so dass in dieser Analyse Proteine, die durch eventuell vorhandene nicht-konventionelle Mechanismen sekretiert werden können, nicht eingeschlossen sind (Nickel, 2003). Bei einer weniger stringenten Proteomanalyse wurden 554 potentiell sekretierter *U. maydis* Proteine identifiziert (Mueller *et al.*, 2008). 168 Proteinen konnte eine mögliche enzymatische Funktion zugewiesen werden, wohingegen die verbleibenden 386 Proteine unbekannte Funktionen besitzen.

Die Zahl potentiell sekretierte lytischer Enzyme in *U. maydis* ist, verglichen mit nekrotrophen Pilzen wie *Magnaporthe grisea* oder *Fusarium graminearum*, sehr gering (Dean *et al.*, 2005; Kämper *et al.*, 2006). Dies steht in Einklang mit der biotrophen Lebensweise von *U. maydis*, die auf eine möglichst geringe Zerstörung der Pflanzenzelle während der pathogenen Phase abzielt (Mendgen und Hahn, 2002; Kämper *et al.*, 2006; Brefort *et al.*, 2008b). Die sekretierten Enzyme sind der Annotation nach hauptsächlich an der Modifikation der pflanzlichen Zellwand während des biotrophen Wachstums von *U. maydis* beteiligt. So wurden neben Glucanasen und Xylanasen auch Pektin-Hydrolasen gefunden, welche der Flexibilisierung der durch Pektin kreuzverknüpften Cellulosefibrillen der Pflanzenzellwand während der Penetration dienen könnten (Doehlemann *et al.*, 2008a; Mueller *et al.*, 2008).

Die genauere Untersuchung der potentiell sekretierten *U. maydis* Proteine ohne bekannte Annotation zeigte, dass ein Großteil der zugehörigen Gene im Genom in Clustern von mindestens drei Genen vorliegt. Das größte Cluster enthält 23 Gene und umfasst mehr als 40 kbp. Außerdem zeigten Transkriptomanalysen, dass die Mehrzahl dieser Gene spezifisch während der biotrophen Phase induziert wird. Dieses trifft dagegen nicht für die direkt benachbarten Gene zu (Kämper *et al.*, 2006). Die Deletion von fünf Genclustern bewirkte starke Veränderungen in der Virulenz der jeweiligen Mutanten, welche von Hypervirulenz über reduzierte Symptome bis hin zu vollständigem Verlust der Pathogenität reichte (Abb. 4). Während des saprophytischen Wachstums und der Filamentbildung auf Aktivkohle-haltigen Platten wiesen die Clustermutanten dagegen keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp auf. Damit stellen diese neuen Effektoren zentrale Modulatoren für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* dar (Kämper *et al.*, 2006). Zudem ist die Mehrzahl der Clustergene in dem verwandten Pilz *S. reilianum* unterdurchschnittlich konserviert, was für einen für Virulenzfaktoren charakteristischen hohen Selektionsdruck spricht (J. Schirawski und R. Kahmann, unveröffentlicht).



**Abb. 4: Pathogenitäts-relevante Gencluster für sekretierte Proteine in *U. maydis*.** Die Abbildung zeigt den physikalischen Aufbau der Cluster (farbige Pfeile) sowie der flankierenden Gene, die für nicht-sekretierte Proteine kodieren (weiße Pfeile). Genfamilien sind durch identische Farben markiert. Die auf DNA-Microarrays basierenden Transkriptomdaten der einzelnen Gene sind in den zugehörigen Diagrammen dargestellt, wobei rote Balken eine Induktion, grüne eine Repression während der biotrophen Phase repräsentieren. Kreuze zeigen Gene an, für die keine Sonden im Microarray vorhanden sind. Die Phänotypen der Clusterdeletionsmutanten im solopathogenen Stamm SG200 sind außerdem angegeben. Deletierte Bereiche sind als dünne Linien unterhalb der Cluster angegeben. Verändert nach Kämper *et al.* (2006).

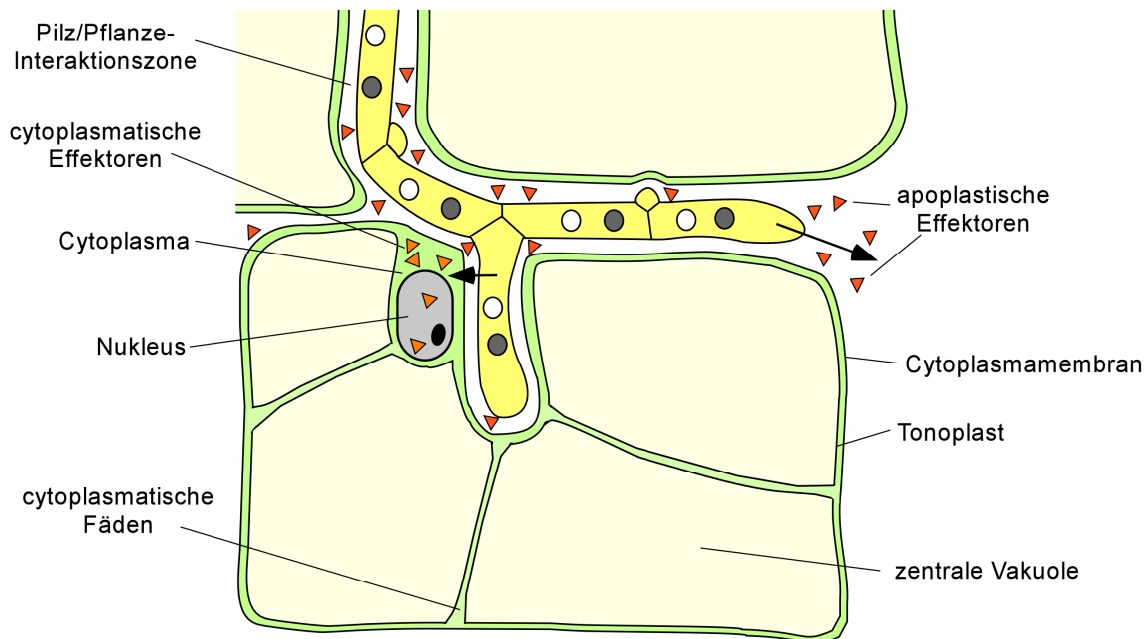
Neben den oben beschriebenen Genclustern wurden mittlerweile zwei weitere Gencluster identifiziert, die neben unbekanntem sekretierten Proteinen auch für Enzyme kodieren (G. Doehlemann, pers. Mitteilung; Doehlemann *et al.*, 2009). Die Deletionen dieser Pit- und Pep-Gencluster resultieren ebenfalls in reduzierter Virulenz bzw. im Verlust der Pathogenität. Doehlemann *et al.* (2009) zeigten, dass der Haupteffektor des Pep-Genclusters, Pep1, eine apoplastische Lokalisierung aufweist. *pep1* Mutanten sind penetrationsdefekt und induzieren starke Abwehrreaktionen der Pflanze (Doehlemann *et al.*, 2009).

Es ist bislang unklar, ob *U. maydis* Effektoren dem Schutz der Pilzhypen in der Pflanze dienen oder die Wirtsabwehr supprimieren (Brefort *et al.*, 2009). Mikroskopische Analysen haben ergeben, dass die Mutanten an jeweils unterschiedlichen Schritten der biotrophen Entwicklung arretieren, so dass davon auszugehen ist, dass die verantwortlichen sekretierten Effektoren distinkte zelluläre Ziele haben (Brefort *et al.*, 2009).

Der genauen Charakterisierung der oben beschriebenen Mutanten mit dem Ziel der Identifizierung der Funktion der Effektorgene gilt zurzeit ein Hauptinteresse in der *U. maydis* Forschung. Die zentrale Frage dabei ist, ob die Effektoren in der apoplastischen Interaktionszone zwischen der Pilzhyphe und der pflanzlichen Cytoplasmamembran agieren,



oder ob sie in die Pflanzenzelle transferiert werden und dort eine cytoplasmatische Funktion erfüllen bzw. im Nukleus wirken (Abb. 5).



**Abb. 5: Schematische Darstellung möglicher Lokalisierungen sekretierter Proteine während der *U. maydis*/Mais-Interaktion.** Die Effektoren werden in den Interaktionsraum zwischen der Pilzhyphe und dem pflanzlichen Symplast abgegeben (rote Dreiecke). Dort können sie beispielsweise mit pflanzlichen Rezeptoren in der Cytoplasmamembran oder mit Proteinen im Apoplasten interagieren. Außerdem könnten *U. maydis* Effektoren in die Pflanzenzelle transloziert werden (orange Dreiecke) und dort im Cytoplasma oder in Zellorganellen, wie dem Nukleus, aktiv sein. Modifiziert nach einer Abb. von A. Hof (nicht publiziert).

## 1.6 Aufgabenstellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte das Gencluster 5B aus *U. maydis* analysiert und charakterisiert werden. Bei dem Cluster 5B handelt es sich um ein aus drei Genen bestehendes Cluster, das im Zuge der Genomanalyse von *U. maydis* identifiziert wurde (vgl. Abb. 4; Kämper *et al.*, 2006). Es war bereits bekannt, dass die Deletion des gesamten Clusters einen vollständigen Verlust der Virulenz gegenüber Mais bewirkt, jedoch keine Auswirkungen auf das saprophytische Wachstum des Pilzes hat. Die von Cluster 5B kodierten Proteine stellten daher interessante Kandidaten für essentielle Pathogenitätsfaktoren von *U. maydis* dar.

Zunächst sollten die für den Clusterdeletionsphänotyp verantwortlichen Haupteffektorgene identifiziert werden. Zudem sollten diese im Bezug auf Lokalisierung und Funktion näher analysiert werden, um Rückschlüsse auf die Rolle während der pathogenen Entwicklung ziehen zu können. Ein wichtiger Ansatzpunkt sollte dabei die Identifizierung von Interaktionspartnern sein.

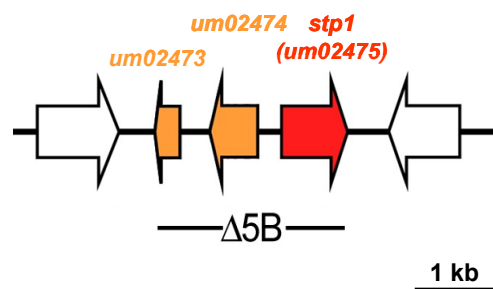
## 2. ERGEBNISSE

### 2.1 Das Cluster 5B aus *U. maydis*

In dieser Arbeit wurde zunächst das Gencluster 5B, das im Rahmen der Genomanalyse von *U. maydis* identifiziert wurde, charakterisiert. Mutanten, in denen das komplette Cluster deletiert worden war, waren apathogen. Das Cluster besteht aus drei Genen, die in der MUMDB unter den Bezeichnungen *um02473*, *um02474* und *um02475* zu finden sind (Abb. 6; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>). Transkriptionsanalysen hatten zudem gezeigt, dass die Expression der Gene *um02474* und *um02475* spezifisch während der biotrophen Entwicklungsphase induziert ist (vgl. Abb. 4). Es war daher davon auszugehen, dass die drei kodierten Proteine wichtige Effektoren für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* darstellen (Kämper *et al.*, 2006).

#### 2.1.1 Organisation des Genclusters 5B in *U. maydis*

Das Gencluster 5B aus *U. maydis* befindet sich auf dem Chromosom 5. Die Gene *um02473* und *um02474* sind in identischer Leserichtung ausgerichtet, wohingegen *um02475* in gegensätzlicher Orientierung auf dem Chromosom arrangiert ist (Abb. 6).



**Abb. 6: Organisation des Clusters 5B auf dem Chromosom 5 von *U. maydis*.** Das Cluster enthält drei Gene. Diese kodieren für Proteine, die nach bioinformatischer Vorhersage ein Signalpeptid für den konventionellen Proteinexport besitzen. Farbige Pfeile symbolisieren die drei im Cluster enthaltenen Gene. Die ersten beiden Gene sind Paraloge, verdeutlicht durch die identische orange Kolorierung. Die weißen Pfeile stellen die flankierenden Gene dar, deren Genprodukte keine Sekretionsvorhersage haben. Abb. verändert nach Kämper *et al.* (2006).

Über die von den drei Clustergenen kodierten Proteine konnten bioinformatisch nur wenige relevante Informationen gewonnen werden. Zwei der kodierten Genprodukte sind relativ klein: Die berechneten Molekulargewichte für Um02473 und Um02474, das Signalpeptid von jeweils etwa 1,9 kDa eingeschlossen, sind 14,9 bzw. 24,9 kDa. Das Protein Um02475 dagegen hat ein höheres Molekulargewicht von 50,6 kDa, wovon 3,0 kDa auf das Signalpeptid entfallen ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)).

Proteinlokalisierungsprogramme, wie beispielsweise TargetP, ermittelten für alle drei Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines funktionellen N-terminalen Signalpeptides (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Diese Vorhersage ließ für die drei Proteine eine Sekretion über das klassische eukaryotische Sekretionssystem vermuten, das den translationsgekoppelten Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Weitertransport über das *cis/trans*-Golgi-Netzwerk und letztendlich die Sekretion durch Exozytose beinhaltet.

Bei Um02473 und Um02474 handelt es sich um Paraloge (Abb. 7). Die Proteine von 135 bzw. 230 Aminosäuren haben bezogen auf die Gesamtproteidlänge eine Aminosäureidentität von 16,5 % (vgl. Abb. 7). Da das Protein Um02473 im Vergleich zu Um02474 um etwa 100 Aminosäuren verkürzt ist, weist die überlappende homologe Region eine höhere Identität von 27,9% auf. Für Um02475 konnte kein Paralog im Genom von *U. maydis* identifiziert werden.

```

Um02473 1 11fklltllvssaaamlekmseiaqkvqvndssppdtda---yhndnatgprndgytllk-ailldyrgyyeagvginwmkypaaafgdaisnaml--igprtdrtf
Um02474 1 qvlgalslsillvhhgppvqsesaktlgealarakpladaesyytcfifrsi-----dndsmerwevkhlstvtelakadcalgsnllisappndtiaayvpgcshsyv

Um02473 127 i-----vsakf-----
Um02474 127 whevackllapsllssgviaallcvlrthvdrgrfgrqpirdrvaslllasvgggpssashsgdvenrdrgyageirelgenplgkvkseehnrhmdneam

```

**Abb. 7: Aminosäuresequenzvergleich der Gene *um02473* und *um02474* aus Cluster 5B in *U. maydis*.** Die Signalpeptide mit einer Länge von 18 Aminosäuren sind rot umrandet (nach SignalP Vorhersage; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Die Sequenzkonservierung beträgt 16,5% (Identität x Überlapp/Länge) bzw. 27, 9% für die konservierte Region (As 1-135). Identische Aminosäuren sind grün hinterlegt (As-Vergleich „Global Protein Alignment“/BLOSUM62 Matrix, Clonemanager 9.0).

Abgesehen von der Sekretionsvorhersage ließen sich bioinformatisch keine Schlüsse auf eine mögliche Funktion der von Cluster 5B kodierten Proteine ziehen. In den zugänglichen Datenbanken waren keine homologen Proteine, bislang beschriebene Domänen, Motive oder Cystein-Patterns auffindbar.

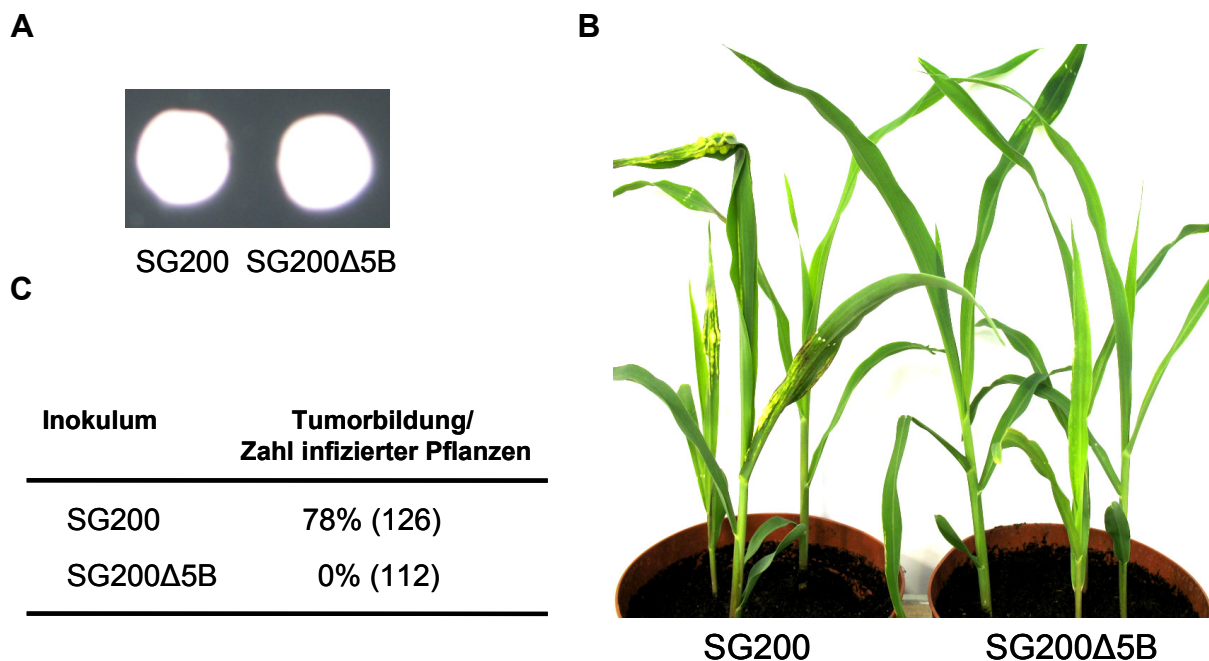
### 2.1.2 Konservierung des Clusters 5B in anderen pflanzenpathogenen Basidiomyceten

*U. maydis* war der erste pflanzenpathogene Basidiomycet, dessen Genomsequenz komplett entschlüsselt wurde (Kämper *et al.*, 2006). Mittlerweile wurden die Genome der nahe verwandten Brandpilze *S. reilianum* und *U. hordei* ebenfalls vollständig sequenziert (J. Schirawski und R. Kahmann, nicht publiziert). Dies ermöglichte die Identifizierung orthologer Gene in diesen Organismen. In beiden Spezies ist das Cluster 5B nur gering konserviert (J. Schirawski und J. Schöning, mündl. Mitteilung). Für die Gene *um02473* und *um02475* konnten in *S. reilianum* und *U. hordei* Orthologe identifiziert werden. Orthologe für das Gen *um02474* waren hingegen in den Genomen der Pilze nicht vorhanden. Auf

Aminosäureebene sind die Proteine Um02474 und Um02475 mit einer Identität von 35 und 55%, d. h. im Vergleich zu einer durchschnittlichen Identität der *U. maydis* und *S. reilianum* Proteine von etwa 75% unterdurchschnittlich, konserviert (J. Schöning, J. Schirawski und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

## 2.2 Identifizierung des Haupteffektorgens in Cluster 5B

Um die Funktion der von Cluster 5B kodierten Proteine während der biotrophen Wachstumsphase von *U. maydis* zu analysieren, wurde das gesamte Gencluster in dem solopathogenen Stamm SG200 deletiert (Kämper *et al.*, 2006). Die entsprechende Deletionsmutante SG200 $\Delta$ 5B zeigte keine Defekte während des b-abhängigen filamentösen Wachstums auf Aktivkohleplatten, das sich durch die Bildung eines weißen Luftmycels auszeichnet. In Maisinfektionen jedoch erzeugte die Cluster 5B Deletionsmutante keinerlei Pathogenitätssymptome (Kämper *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden und sind in Abb. 8 dargestellt.



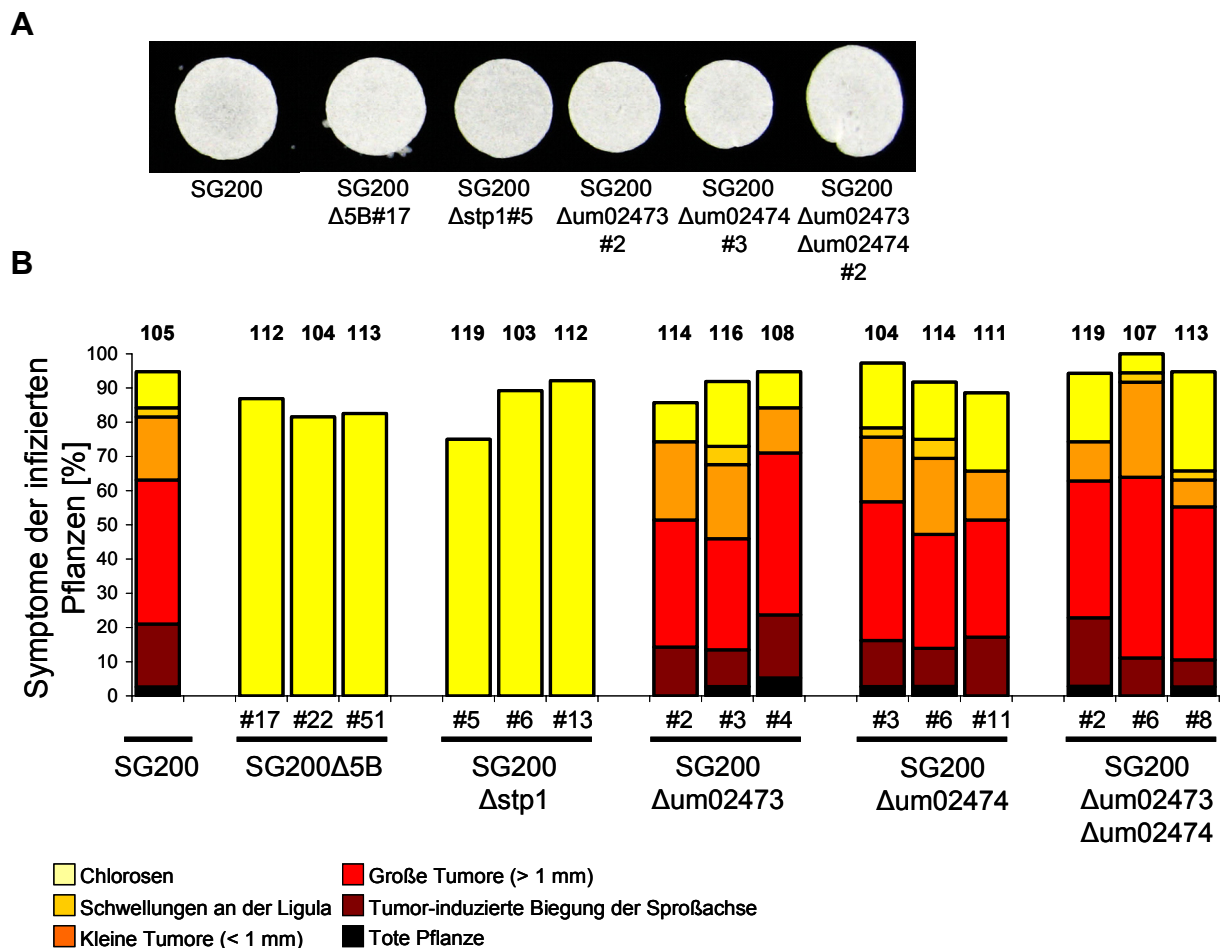
**Abb. 8: Pathogenitäts-relevante Untersuchungen der Cluster 5B Deletionsmutante.** **A:** Filamentbildung auf Aktivkohle-haltigen Platten. **B:** Maispflanzen nach SG200 bzw. SG200 $\Delta$ 5B Infektion (12 dpi). Nur mit SG200 infizierte Pflanzen zeigten typische Pathogenitätssymptome wie starke Chlorosen, Tumorbildung und Anthozyanproduktion. **C:** Virulenz der Clusterdeletionsmutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm SG200. Dargestellt sind die Boniturdaten zwölf Tage nach Infektion.

Spritzinfektionen sieben Tage alter Maispflanzen mit dem solopathogenen Ausgangsstamm SG200 resultierten in einer Tumorrates von ca. 80%. In den meisten Fällen konnte auch Anthozyanbildung beobachtet werden. Dahingegen wiesen Maispflanzen nach Infektion mit

SG200 $\Delta$ 5B keinerlei Tumor- oder Anthozyanbildung auf (Abb. 8). Diese Pflanzen prägten lediglich leichte Chlorosen aus (nicht gezeigt).

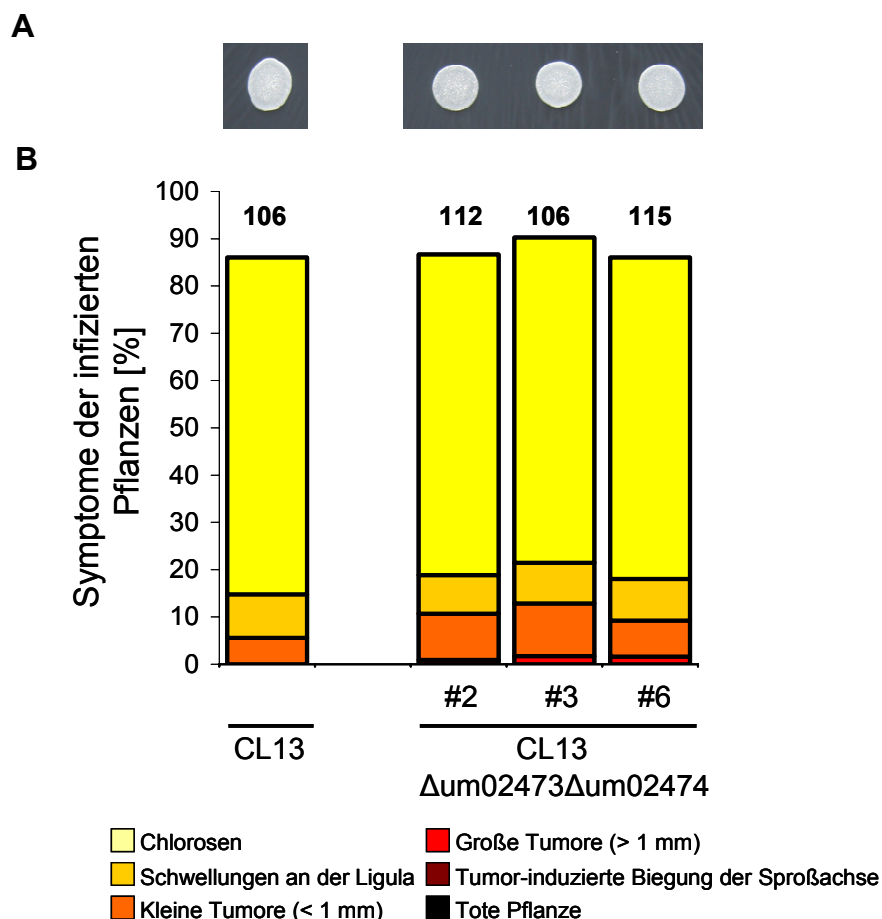
### 2.2.1 Deletionsanalysen zur Identifizierung des Haupteffektorgens

Zunächst sollte herausgefunden werden, welche(s) der drei Gene verantwortlich für den Pathogenitätsverlust der Cluster 5B Deletionsmutante ist. Daher wurden mittels homologer Rekombination im solopathogenen Stamm SG200 drei Einzelgen-Deletionsmutanten generiert (SG200 $\Delta$ um02473; SG200 $\Delta$ um02474 u. SG200 $\Delta$ um02475; vgl. Abb. 6). Zudem wurde für den Fall, dass die Paraloge eine redundante Funktion ausüben, auch eine Doppel-Deletionsmutante der Gene *um02473* und *um02474* hergestellt (SG200 $\Delta$ um02473 $\Delta$ um02474).



**Abb. 9: Virulenzanalyse der Einzel- und Doppeldeletionsstäme zur Identifizierung des Haupteffektorgens aus Cluster 5B.** **A:** Filamentbildung auf Aktivkohleplatten. Repräsentativ ist jeweils eine Mutante der verschiedenen Stämme gezeigt. **B:** Virulenz von Einzel- und Doppel-Deletionsmutanten der Gene in Cluster 5B im Vergleich zum Vorläuferstamm SG200. Angegeben sind die Boniturdaten zwölf Tage nach Infektion, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Infektionen darstellen. Die Stärke der Krankheitssymptome wurde wie in Kämper *et al.* (2006) beschrieben evaluiert. Die Gesamtzahl infizierter Pflanzen ist für jede Mutante über der jeweiligen Säule angegeben.

Jeweils drei unabhängig generierte Deletionsstämme wurden bezüglich ihrer Virulenz getestet. Dazu wurden sieben Tage alte Maispflanzen mittels Spritzinokulation infiziert und sechs bzw. zwölf Tage nach Infektion bezüglich ihrer Virulenzsymptome analysiert (Abb. 9). Alle generierten Mutanten zeigten intakte Filamentbildung auf Aktivkohle-haltigem Medium (Abb. 9A und nicht gezeigt). Nach Deletionen von *um02473*, *um02474* bzw. Doppeldeletion beider Gene wiesen die resultierenden Stämme keine veränderte Pathogenität im Vergleich zur Infektion mit SG200 auf (Abb. 9B). Nur SG200 $\Delta$ *um02475* war apathogen und entsprach somit dem Phänotyp des Cluster 5B Deletionsstammes (Abb. 9B). Diese Daten ließen vermuten, dass das Gen *um02475* allein verantwortlich für den apathogenen Phänotyp der Cluster 5B Deletionsmutante ist und daher für den Haupteffektor aus Cluster 5B kodiert.



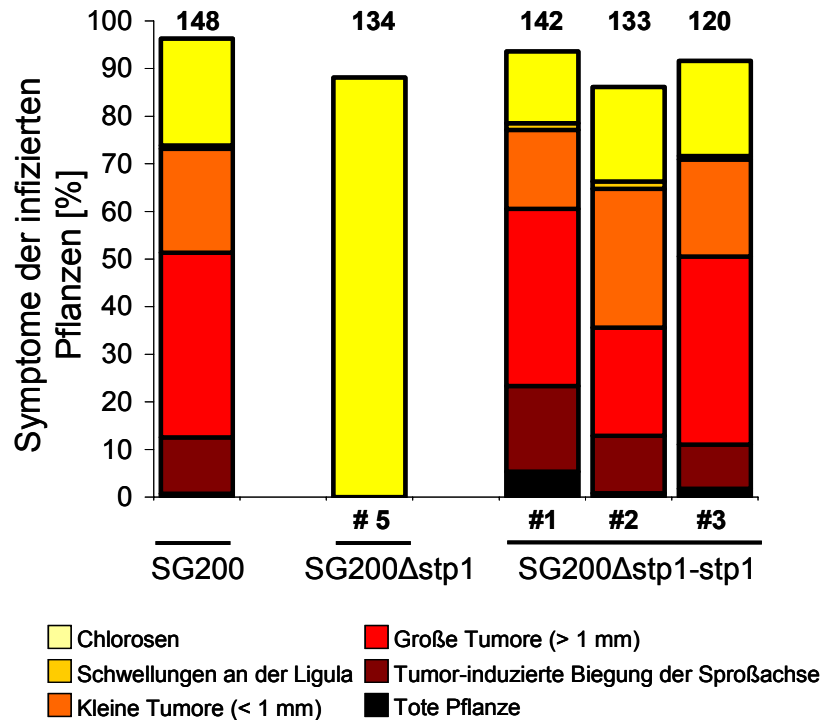
**Abb. 10: Virulenz von CL13 $\Delta$ um02473 $\Delta$ um02474.** A: Filamentbildung der in B aufgeführten Stämme auf Aktivkohleplatten. B: Virulenz der Doppeldeletionsmutanten CL13 $\Delta$ um02473 $\Delta$ um02474 im Vergleich zum Ausgangsstamm CL13. Angegeben sind die Boniturdaten zwölf Tage nach Infektion, die Mittelwerte aus drei unabhängigen Infektionen darstellen. Die Stärke der Krankheitssymptome wurde wie in Kämper *et al.* (2006) beschrieben evaluiert. Die Gesamtzahl infizierter Pflanzen ist für jede Mutante über der jeweiligen Säule angegeben.

In vorangegangenen Arbeiten wurde für verschiedene *U. maydis* Gene gezeigt, dass geringe Effekte auf die Pathogenität im SG200 Hintergrund nur schwer darstellbar sind (Di Stasio *et*

*al.*, 2009; K. Heidrich, pers. Mitteilung). Um auszuschließen, dass die paralogen Gene *um02473* und *um02474* einen nur sehr geringen Effekt auf die Pathogenität von *U. maydis* haben, wurden beide Gene zusätzlich im Stamm CL13 deletiert (CL13Δ*um02473*Δ*um02474*). Dieser Stamm ist der Vorläufer von SG200, enthält aber im Gegensatz zu SG200 kein kompatibles *a* Pheromon, sondern nur *bE1/bW2* Gene. Dieses führt zu abgeschwächter Filamentbildung auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten sowie zu einer stark attenuierten Virulenz mit einer durchschnittlichen Tumorbildungsrate von nur etwa 10 bis 20% (Bölker *et al.*, 1995). Die Deletion der Paraloge *um02473* und *um02474* in CL13 führte jedoch zu keiner signifikanten Reduktion der Virulenz im Vergleich zum CL13 Ausgangsstamm (Abb. 10). Mit den verfügbaren Mitteln konnte also kein Effekt dieser beiden Gene auf die Virulenz von *U. maydis* nachgewiesen werden. Der Phänotyp der Cluster 5B Deletion im SG200 Hintergrund ließ sich folglich einzig auf die Deletion des Genes *um02475*, im Folgenden nur noch mit *stp1* (*stop after penetration 1*) bezeichnet, zurückführen.

### 2.2.2 Komplementation der *stp1* Mutante

Um zu verifizieren, dass der apathogene Phänotyp der SG200Δ*stp1* Mutanten auf die Deletion des *stp1* Genes und nicht auf Seiteneffekte oder Mutationen in den Flankenregionen zurückzuführen ist, wurde das Plasmid p123-P*stp1*-*stp1*, in dem das *stp1* Gen unter Kontrolle seines endogenen Promotors (*P<sub>stp1</sub>*) vorliegt, in den *ip*-Lokus (Loubradou *et al.*, 2001) von SG200Δ*stp1* integriert (SG200Δ*stp1*-*stp1*). Drei unabhängig erzeugte SG200Δ*stp1*-*stp1* Stämme, die sich in der Kopienzahl des integrierten Plasmides unterschieden, wurden in Pflanzeninfektionen auf die Fähigkeit zur Komplementation des apathogenen Phänotyps von SG200Δ*stp1* getestet (Abb. 11). Alle drei Stämme zeigten mit SG200 vergleichbare Pathogenitätssymptome, d. h. das eingebrachte *stp1* Gen komplementierte den *stp1* Deletionsphänotyp vollständig. Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass *stp1* verantwortlich für die Apathogenität von SG200Δ*stp1* ist. Die Kopienzahl des Komplementationskonstruktes im *ip*-Lokus hatte dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Komplementation (Abb. 11).

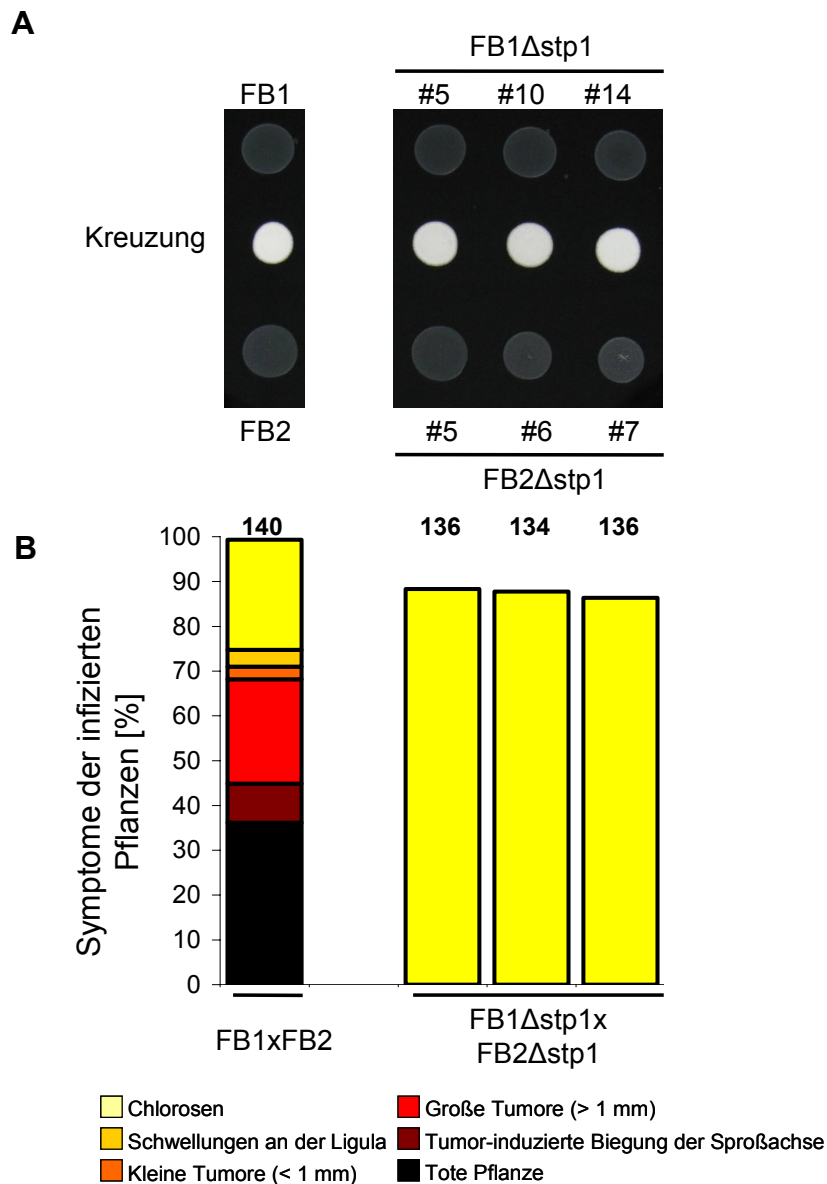


**Abb. 11: Virulenz der Komplementationsstämme SG200Δstp1-stp1.** Dargestellt ist die Virulenz der Komplementationsstämme im Vergleich zu SG200 sowie zu SG200Δstp1#5, dem Ausgangsstamm für die Komplementation. Angegeben sind die Boniturdaten (Kämper *et al.*, 2006) zwölf Tage nach Infektion, die in drei unabhängigen Infektionen generiert wurden und Mittelwerte darstellen. Die Gesamtzahl infizierter Pflanzen ist für jede Mutante über der jeweiligen Säule angegeben. Die SG200Δstp1 Stämme #1 und #3 weisen Einzelkopieinsertionen von p123-Pstp1-stp1 auf, #2 trägt eine Mehrfachintegration des Plasmides im *ip*-Lokus.

### 2.2.3 Auswirkung der *stp1* Deletion in kompatiblen Wildtypstämmen

Da es sich bei dem solopathogenen Stamm SG200 um einen künstlich erzeugten Stamm zur vereinfachten Bestimmung von Pathogenitätsveränderungen handelt, welcher zudem eine leicht attenuierte Virulenz gegenüber der Kreuzung kompatibler Wildtypstämmen aufweist, wurde die Auswirkung einer *stp1* Deletion für die Pathogenität von *U. maydis* auch in kompatiblen Wildtypstämmen untersucht. Dazu wurde das *stp1* Gen in FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) deletiert, so dass die Stämme FB1Δstp1 und FB2Δstp1 entstanden. Die *stp1* Deletion in FB1 und FB2 hatte keinen Einfluß auf die Zellfusion und die Entstehung dikaryotischer Filamente (Abb. 12A). Die Coinokulation von FB1Δstp1 und FB2Δstp1 in die Pflanze führte jedoch zur völligen Apathogenität (Abb. 12B). Wie in SG200Δstp1 Infektionen konnten wiederum nur Chlorosen, jedoch keine Tumorbildung beobachtet werden. Daraus konnte nun sicher geschlossen werden, dass Stp1 ein essentieller Pathogenitätsfaktor von *U. maydis* ist.





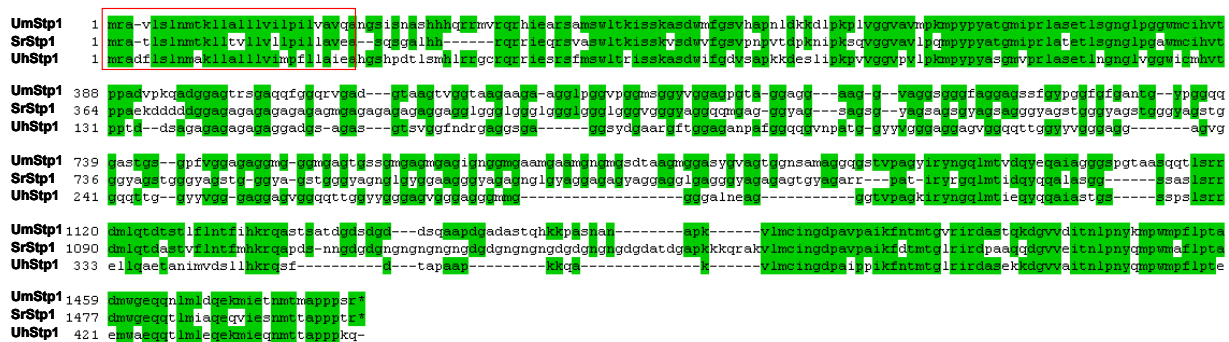
**Abb. 12: Virulenz von *stp1* Deletionsmutanten in kompatiblen Wildtypstämmen.** **A:** Filamentbildung auf Aktivkohleplatten. FB1 und Derivate wurden in der oberen Reihe, FB2 und Derivate in der unteren Reihe getropft. Die mittlere Reihe zeigt die Kreuzungen der jeweiligen Stämme. **B:** Virulenz den kompatiblen Stämme FB1xFB2 im Vergleich zu den jeweiligen kompatiblen FB1Δstp1xFB2Δstp1 Kreuzungen. In den Kreuzungen wurden die jeweils über der Säule in A abgebildeten Mutantenkombinationen eingesetzt. Dargestellt sind die Boniturdaten zwölf Tage nach Infektion, welche aus drei unabhängigen Infektionen gemittelt wurden. Die Gesamtzahl infizierter Pflanzen ist für jede Mutante über der jeweiligen Säule angegeben.

#### 2.2.4 Bioinformatische Analyse von *Stp1*

In den zugänglichen Datenbanken fanden sich keinerlei Information über Homologien oder bislang bekannte Domänen in *Stp1*. Auch mittels bioinformatischer Vorhersageprogramme konnten weder Domänen noch Sekundärstrukturen vorhergesagt werden. Zwei Cysteinreste, die an Position 125 und 460 der Aminosäuresequenz von *Stp1* lokalisiert sind, könnten strukturelle Bedeutung für das Protein haben. Ein Aminosäuresequenzvergleich der *Stp1* Proteine aus *U. maydis* (*UmStp1*), *S. reilianum* (*SrStp1*) und *U. hordei* (*UhStp1*) zeigte, dass

über die Gesamtlänge SrStp1 eine Identität von 55% und UhStp1 eine Identität von 52% zu UmStp1 aufweist. Im Vergleich aller drei Proteine ergab sich eine Identität von noch 40%. Die zwei Cysteinreste in UmStp1 waren in SrStp1 und UhStp1 konserviert (Abb. 13).

Der Aminosäuresequenzvergleich zeigte weiterhin, dass der N-terminale Teil (As 1-132) sowie große Abschnitte des C-terminalen Bereiches (As 339-394 u. As 430-515) in allen drei Proteinen sehr konserviert vorliegen. Diese Bereiche könnten folglich funktionelle Domänen von Stp1 darstellen. Die Primärstruktur des zentralen Teils dagegen ist hoch variabel, jedoch immer reich an Glycinresten (~As 133-429).



**Abb. 13: Aminosäuresequenzvergleich der drei bekannten Stp1 Homologe aus *U. maydis* (UmStp1), *S. reilianum* (SrStp1) und *U. hordei* (UhStp1).** Auf Proteinebene zeigt das UmStp1 bezogen auf die Gesamtlänge eine Identität von 55% bzw. von 52% zu den Proteinen SrStp1 und UhStp1. Vergleicht man alle drei Proteine ergibt sich eine Identität von 40%. Sowohl die N- als auch die C-terminalen Teile der Proteine sind hochkonserviert, wohingegen die zentrale, Glycin-reiche Region sehr variabel ist. Die Signalpeptide mit einer Länge von 28 bzw. 29 Aminosäuren sind rot dargestellt (nach SignalP Vorhersage; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Identische Aminosäuren sind grün hinterlegt (As-Vergleich „Global Protein Alignment“/BLOSUM62 Matrix, Clonemanager 9.0).

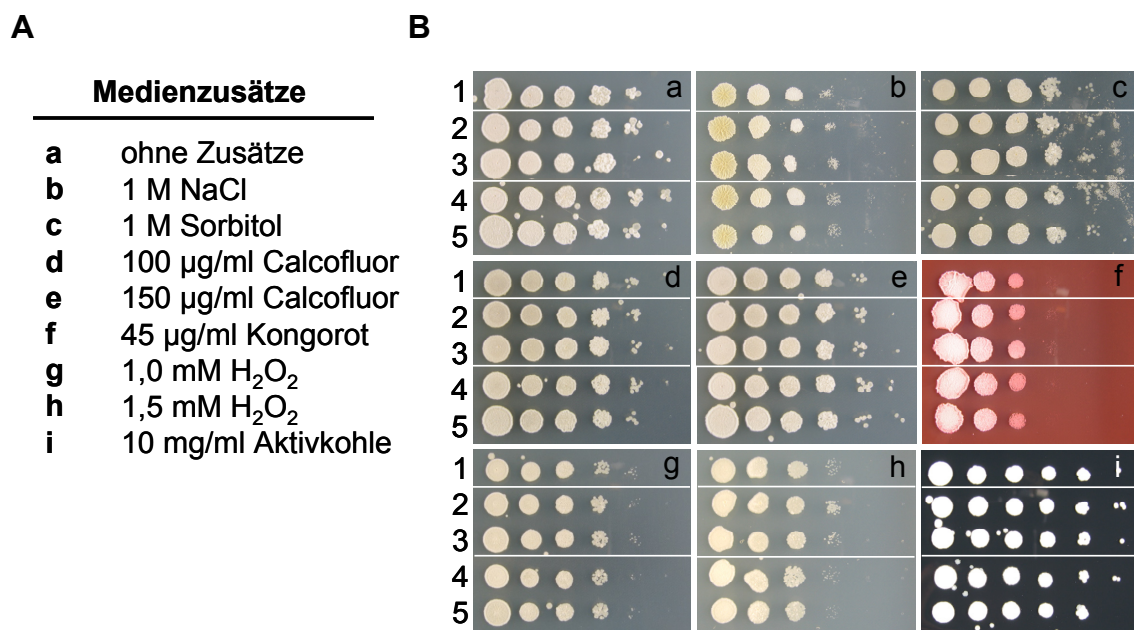
### 2.3 Charakterisierung des Phänotyps von SG200Δstp1 Mutanten

Um herauszufinden, wie sich der in Pflanzeninfektionen apathogene Stamm SG200Δstp1 während des saprophytischen und biotrophen Wachstums von dem Vorläuferstamm SG200 unterscheidet, wurden verschiedene Stadien des Lebenszyklus näher untersucht. Neben dem saprophytischen Wachstum auf Voll- und Minimalmedium wurde Stresssensitivität, b-induzierte Filamentbildung sowie der genaue Infektionsverlauf von SG200Δstp1 im Vergleich zu SG200 untersucht. Weiterhin wurden frühe Infektionsstrukturen quantifiziert, um auszuschließen, dass Defekte bei der Appressorienbildung oder der Penetration für den apathogenen Phänotyp verantwortlich sind.

### 2.3.1 Saprophytisches Wachstum von *stp1* Deletions- und Überexpressionsstämmen

In axenischer Kultur konnten für SG200 $\Delta$ *stp1* keine Wachstums- oder Morphologieveränderungen im Vergleich zu SG200 festgestellt werden. Die Geschwindigkeit des hefeartigen Wachstums von SG200 $\Delta$ *stp1* in Flüssigmedien entsprach ebenfalls der des Vorläuferstammes. Auch bezüglich des Wachstums sowie der Koloniemorphologie auf Minimal- und Vollmedienplatten zeigte SG200 $\Delta$ *stp1* keine Unterschiede zu SG200 (nicht gezeigt).

Um die Bedeutung von Stp1 für das saprophytische Wachstum unter unterschiedlichen Stressbedingungen zu testen, wurde das Wachstum von *stp1* Deletionsstämmen sowie *stp1* Überexpressionsstämmen (s. u.) auf verschiedenen Stressmedien untersucht (Abb. 14A). Die getesteten Substanzen dienten der Induktion von oxidativem Stress ( $H_2O_2$ ), osmotischem Stress (Sorbitol, NaCl) und Zellwandstress (Kongorot).



**Abb. 14: Stresssensitivitätstests und filamentöses Wachstum von *stp1* Deletions- und Überexpressionsstämmen.** **A:** Zusätze für Medien, die für die Sensitivitätstests unterschiedlicher *stp1* Deletions- und Überexpressionsstämmen verwendet wurden. Für **a-h** wurde CM-Glukose-Medium mit den entsprechenden Substanzen versetzt. Bei **i** handelte es sich um PD-Platten, die zur Induktion von b-Filamenten mit Aktivkohle versehen wurden. **B:** Die aufgeführten Stämme wurden in 10er-Verdünnungen auf die Stresssubstanz-haltigen Medien sowie PD-Aktivkohleplatten getropft. **1:** SG200; **2:** SG200 $\Delta$ *stp1*#5; **3:** SG200 $\Delta$ *stp1*#6; **4:** SG200Potefstp1#1; **5:** SG200Potefstp1#4. **a-i** reflektiert die zugesetzte Substanz (s. A), wobei **a** als Wachstumskontrolle ohne Zusätze fungierte.

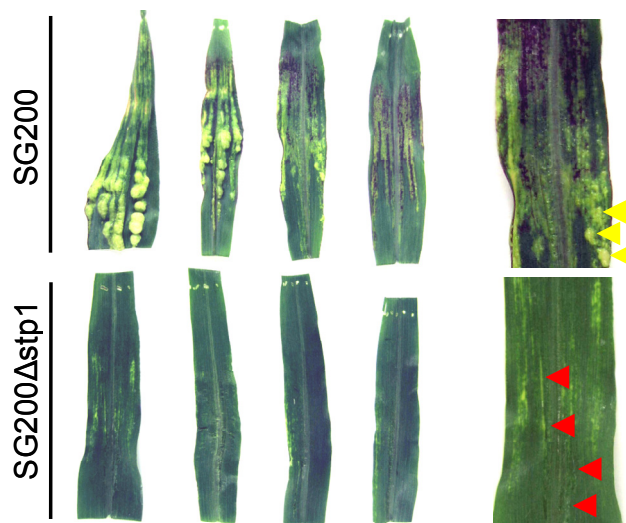
Da die *stp1* Transkription erst während des biotrophen Wachstums induziert wird, wurde neben SG200 $\Delta$ *stp1* auch ein *stp1* Überexpressionsstamm getestet. Dazu wurde ein Stamm konstruiert, der *stp1* unter der Kontrolle des starken konstitutiven *otef*-Promotors überexprimiert (SG200Potefstp1). Im Vergleich zu SG200 konnte kein verändertes Wachstum

der Mutante SG200 $\Delta$ stp1 und von SG200Potefstp1 auf Stress-induzierenden Medien beobachtet werden (Abb. 14B). Auch bezüglich der Differenzierung b-abhängiger Filamente auf Aktivkohle-haltigen Platten zeigten SG200 $\Delta$ stp1 und *stp1* Überexpressionsstämme keine Veränderungen gegenüber SG200 (Abb. 14B).

### 2.3.2 Mikroskopische Charakterisierung des Infektionsverlaufes von SG200 $\Delta$ stp1

Makroskopisch waren nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 keine Virulenzsymptome in Maispflanzen erkennbar. Lediglich leichte Chlorosen im Bereich der Infektionseinstiche konnten ausgemacht werden. Ab etwa zwei bis drei Tagen nach Infektion konnten zudem im Vergleich zu SG200 Infektionen in mit SG200 $\Delta$ stp1 infizierten Bereichen zunehmend leichte Nekrosen in Form von kollabierten Pflanzenzellen und selten größere lochförmige Läsionen, beobachtet werden (Abb. 15). Die Pflanzenblätter verloren in diesen Bereichen ihre glatte Oberflächenstruktur und wiesen eine eingefallene Gewebestruktur auf.

Um näher zu untersuchen, in welchem Stadium des biotrophen Wachstums die *stp1* Deletionsmutante Defekte aufweist, wurden die unterschiedlichen Infektionsstadien mikroskopisch verfolgt. Dazu wurden verschiedene Färbungen durchgeführt. In allen Fällen wurde das dritte Blatt etwa zwei Zentimeter unterhalb der Infektionseinstiche analysiert.



**Abb. 15: Nekrosebildung nach Infektion von Maispflanzen mit SG200 $\Delta$ stp1 im Vergleich zu SG200.** Dargestellt sind je vier infizierte Maisblätter mit typischen Symptomen, die von links nach rechts in der Stärke abnehmen. Rechts ist jeweils eine Vergrößerung typischer Symptome abgebildet. Gelbe Pfeile deuten auf entstehende Tumore; rote Pfeile zeigen kollabiertes Pflanzengewebe an. Die Maisblätter verloren in diesen Bereichen ihre glatte Oberflächenstruktur und wiesen stattdessen eine eingefallene Gewebestruktur auf, die teilweise mit der Bildung von nekrotischen Läsionen einherging.

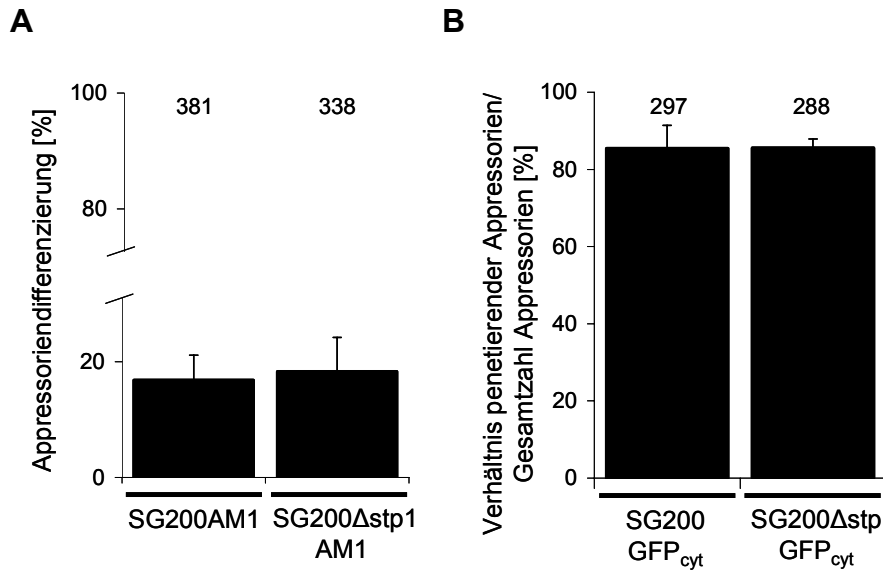
Zunächst wurden die extrazellulären Stadien auf der Pflanzenoberfläche untersucht. Wie oben beschrieben war bereits bekannt, dass die *stp1* Deletionsmutante b-Filamente auf Aktivkohle-

haltigem Medium bilden konnte. Auch die Filamentbildung auf der Pflanze zeigte, wie mittels Calcofluor White-Färbung nachgewiesen werden konnte, keine Unterschiede zu der von SG200 (nicht gezeigt). Calcofluor White weist hohe Affinität zu  $\beta$ -1-4-Glukanen auf und visualisiert so die Chitinhülle von *U. maydis*. Allerdings dringt es nicht in die Pflanzengewebe ein und färbt daher nur exponierte Oberflächenstrukturen der Pflanze sowie pilzliche Hyphen auf der Blattoberfläche. Mit der Calcofluor White-Färbung konnte zudem nachgewiesen werden, dass die *stp1* Deletionsmutante fähig ist, Appressorien auszdifferenzieren. Dieses wurde wie in SG200 Infektionen etwa 16 Stunden nach Infektion initiiert (Abb. 17A).

Um auszuschließen, dass der Anteil Appressorien-differenzierender Hyphen in der *stp1* Deletionsmutante verringert ist, wurde in SG200 $\Delta$ *stp1* und SG200 Infektionen das Verhältnis gebildeter Appressorien zur Gesamtzahl der Hyphen auf der Blattoberfläche bestimmt. Dieses geschah mit Hilfe eines „Appressorienmarkers“ (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Der Marker basiert auf einer Fusion von 3x *egfp* an den Promotor des Gens *um01779* (*P<sub>um01779</sub>3xegfp*). Die Expression dieses Gens wird spezifisch in Hyphenspitzen, die Appressorien ausdifferenzieren, induziert. Appressorien-ausbildende Hyphen können so aufgrund der Akkumulation cytoplasmatischen GFPs im Fluoreszenzmikroskop leicht identifiziert werden. Durch Gegenfärbung der Gesamtheit aller auf der Maisoberfläche wachsenden Hyphen mit Calcofluor White ist es möglich, das Verhältnis von Appressorien-ausbildenden Hyphen zur Anzahl aller Filamente zu quantifizieren.

Um die Appressorienbildung in der *stp1* Deletionsmutante untersuchen zu können, wurde das Plasmid pAM1 (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009) im *ip*-Lokus des Stammes SG200 $\Delta$ *stp1* integriert, so dass der Stamm SG200 $\Delta$ *stp1*AM1 generiert wurde. Der dazugehörige Kontrollstamm SG200AM1 war bereits vorhanden und wurde von Dr. A. Mendoza-Mendoza zur Verfügung gestellt (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass 16 Stunden nach Infektion 18,3% aller *on planta* Hyphen des *stp1* Deletionstammes Appressorien bildeten (18,3%  $\pm$  5,9 SD; n = 338 Hyphen; Abb. 16A). Diese Zahl unterschied sich nicht signifikant von der für SG200 ermittelten, wo 16,8% aller Hyphen Appressorien bildeten (16,8%  $\pm$  4,3 SD; n = 381 Hyphen). Daher konnte der apathogene Phänotyp von SG200 $\Delta$ *stp1* nicht auf eine verminderte Bildung von Appressorien zurückgeführt werden.

Auch eine erfolgreiche Penetration der Blattepidermis konnte in SG200 $\Delta$ *stp1* beobachtet werden (Abb. 17B). Dazu wurde das infizierte Pflanzengewebe mit Chlorazol Black E gefärbt. Dieser Farbstoff visualisiert durch spezifische Bindung an Chitin Pilzhyphen und vermag zudem nach entsprechender Behandlung in das Gewebe einzudringen, so dass intra- und interzellulär wachsende Hyphen sichtbar werden.

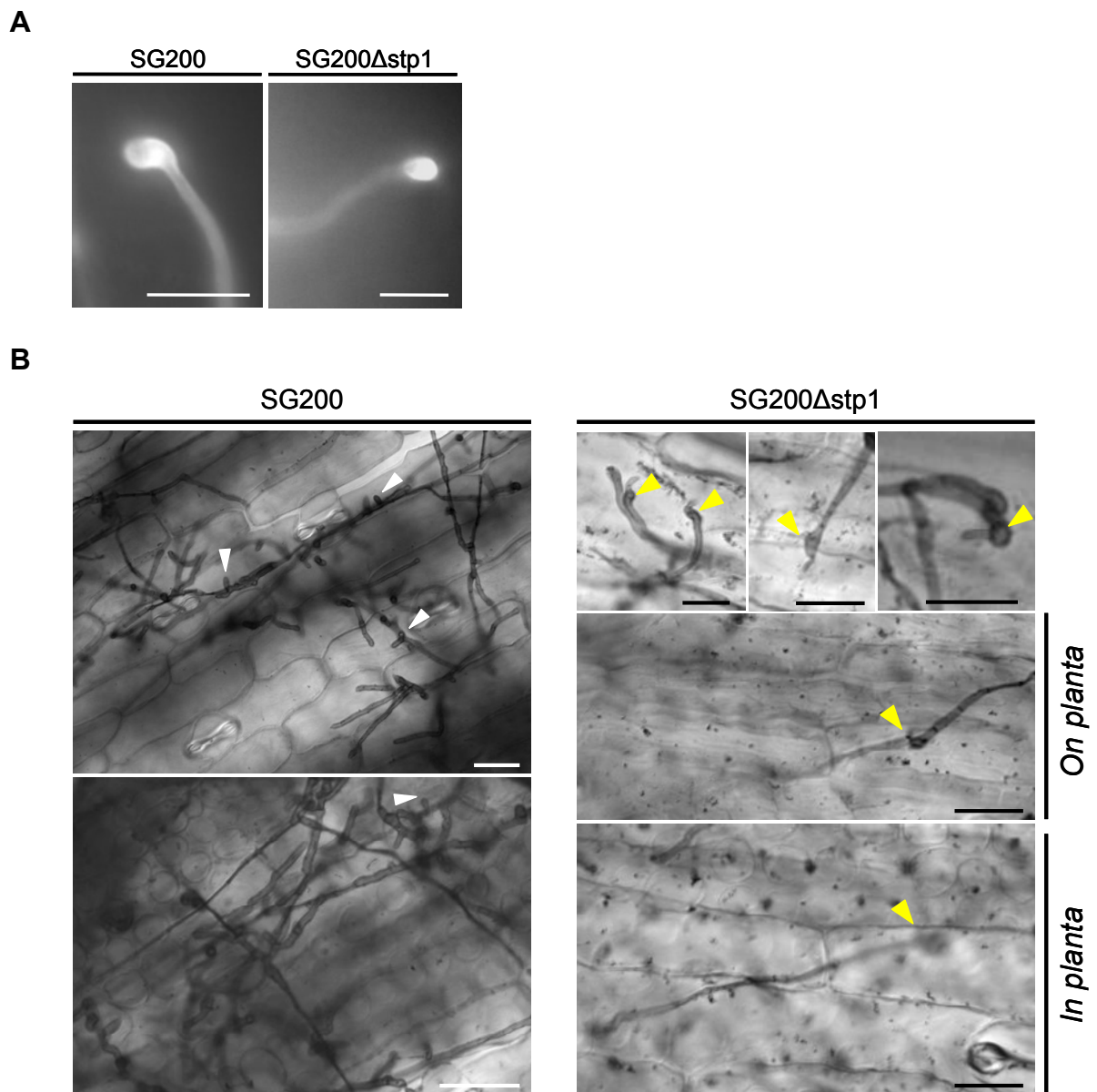


**Abb. 16: Quantifizierung der Appressorienbildung und Penetrationseffizienz von SG200Δstp1 im Vergleich zu SG200.** Beide Experimente wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt, wobei jeweils die 3. Blätter von mindestens drei unterschiedlichen Pflanzen ausgewertet wurden. **A:** Quantifizierung der Appressorienbildung von SG200Δstp1AM1 im Vergleich zu SG200AM1 (16 hpi). AM1 bezeichnet das Vorhandensein eines Appressorienmarkers in den beiden Stämmen (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Dieser induziert in Filamenten, die Appressorien ausdifferenzieren, eine cytoplasmatische GFP Akkumulation. Zur Bestimmung des Verhältnisses zwischen der Gesamtzahl der *on planta* Hyphen zu Appressorien-bildenden Hyphen wurden *on planta* Hyphen mit Calcofluor White gegengefärbt. **B:** Quantifizierung der Penetrationseffizienz (24 hpi). Hier wurden Stämme verwendet, die konstitutiv *gfp* exprimieren, so dass es zu einer Akkumulation von cytoplasmatischem GFP kommt. Zur Ermittlung der Penetrationseffizienz wurde das Verhältnis penetrierender Appressorien zur Gesamtzahl aller Appressorien bestimmt. Zur Visualisierung der Appressorien *on planta* wurde Calcofluor White verwendet. Penetrierende Appressorien konnten durch die cytoplasmatische GFP Akkumulation in der Penetrationshyphne erkannt werden, in die Calcofluor White nicht vordringen kann.

Um auszuschließen, dass der *stp1* Deletionsstamm eine verringerte Penetrationsrate im Vergleich zum SG200 Vorläuferstamm aufweist, wurde diese ebenfalls quantifiziert. Dazu wurden Stämme generiert, die konstitutiv *gfp* exprimierten (SG200GFP<sub>cyt</sub> bzw. SG200Δstp1GFP<sub>cyt</sub>). Durch Gegenfärbung von auf der Blattoberfläche befindlichen Hyphen konnten penetrierende und nicht-penetrierende Appressorien identifiziert werden: Calcofluor White drang nicht in die Penetrationshyphne vor, das cytoplasmatische GFP-Signal jedoch war dort vorhanden. Das Verhältnis penetrierender Appressorien zur Gesamtzahl der Appressorien lag sowohl im Stamm SG200GFP<sub>cyt</sub> als auch im *stp1* Deletionsstamm SG200Δstp1GFP<sub>cyt</sub> bei etwa 80%. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Apathogenität von SG200Δstp1 nicht auf eine verringerte Penetrationseffizienz zurückzuführen ist (Abb. 16B).

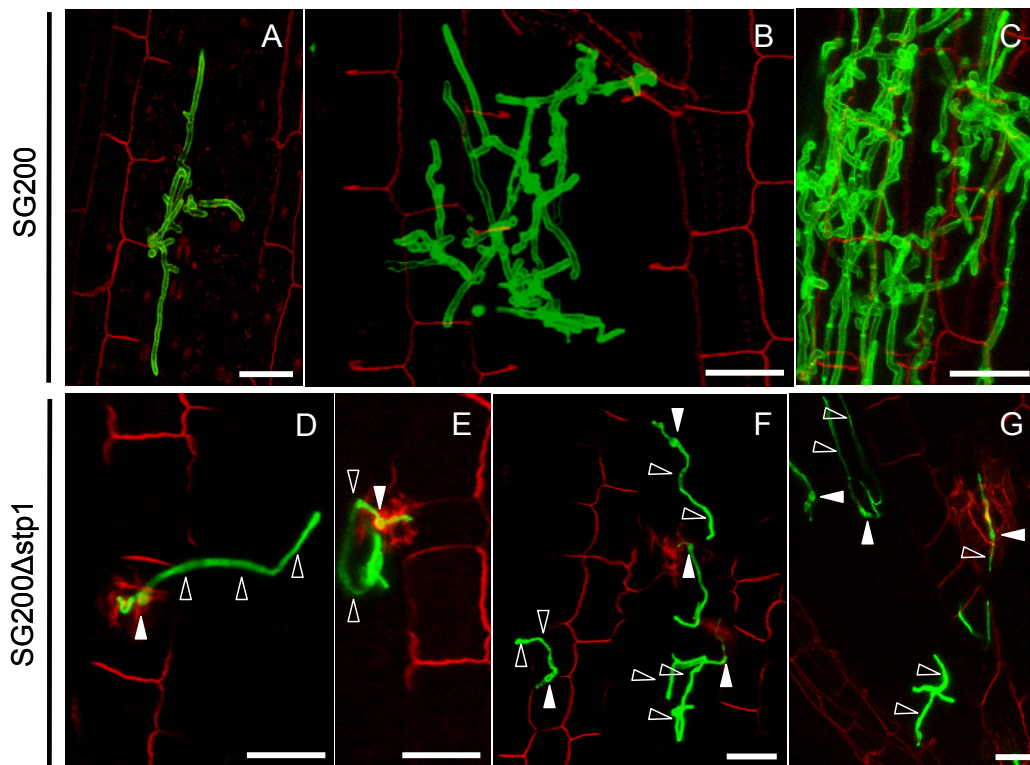
Mit Hilfe der bereits erwähnten Chlorazol Black E-Färbung konnte jedoch festgestellt werden, dass sich der Infektionsverlauf von SG200Δstp1 nach Penetration der Epidermis gravierend von dem des Vorläuferstammes SG200 unterscheidet. So konnte nach Infektion mit SG200Δstp1 keine Proliferation der Pilzhyphen im Blattgewebe festgestellt werden (Abb.

17B). Stattdessen arretierten die SG200 $\Delta$ stp1 Penetrationshyphen meist direkt nach dem Durchdringen der Pflanzenoberfläche in der ersten Epidermiszelle. Zwei Tage nach Infektion konnten nur wenige Hyphen identifiziert werden, die etwas weiter in die pflanzliche Epidermis vorgedrungen waren. In diesen wechselten sich dickere und dünnere Hyphenabschnitte ab und das für den Wildtyp typische Myzel mit schallenartigen Fortsätzen fehlte (Abb. 17B). Ein Vordringen der SG200 $\Delta$ stp1 Hyphen in das Mesophyll konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 17: Mikroskopische Visualisierung von frühen Stadien der Infektion von SG200 $\Delta$ stp1 im Vergleich zu SG200.** Orange Pfeile deuten auf penetrierende Appressorien. Der Größenstandard beträgt jeweils 25  $\mu$ m. **A:** Differenzierung von *U. maydis* Appressorien auf der Pflanzenoberfläche, visualisiert mit Calcofluor White (16 hpi). **B:** Proliferation von SG200 sowie Penetration und Arrest der SG200 $\Delta$ stp1 Mutante (jeweils 2 dpi). Die Pilzstrukturen wurden mit Chlorazol Black E angefärbt. In SG200 Infektionen wurden Schnallenstrukturen mit weißen Pfeilen markiert. *On planta*: Fokus auf die Pflanzenoberfläche, *In planta*: Fokus auf die Blattepidermis; bei jeweils identischer Blattposition aufgenommen (2 dpi). Penetrationsorte sind mit gelben Pfeilen markiert.

Um die durch Calcofluor White und Chlorazol Black E-Färbung gewonnenen Ergebnisse durch eine dritte Färbemethode zu komplementieren, wurde außerdem eine WGA-AF488/Propidium-Iodid (WGA-AF488/PPI) Färbung von infiziertem Pflanzenmaterial durchgeführt. WGA-AF488 („wheat germ agglutinin“) ist ein an den grün fluoreszierenden Farbstoff Alexafluor488-gekoppeltes Lektin, das an die Chitinzellwand der Pilzhyphen bindet. Propidium-Iodid dagegen färbt in intakten Pflanzenzellen die Zellwand rot (Abb. 18). Ist die Zellintegrität gestört, so kommt es durch Nukleinsäureinterkalation auch zur Färbung des Nukleus und anderer intrazellulärer Strukturen. Dieses wird in vitalen Zellen verhindert, da der Farbstoff nicht membrangängig ist. WGA-AF488/PPI gefärbte Präparate können mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert und die Signale durch Überlagerung von Bildern dreidimensional dargestellt werden.



**Abb. 18: WGA-AF488/PPI-Färbung von Maisgewebe nach SG200 bzw. SG200 $\Delta$ stp1 Infektion.** Die verschiedenen Pilzstrukturen auf der Pflanzenoberfläche sowie innerhalb des Pflanzengewebes wurden mittels WGA-AF488 angefärbt und sind in grün dargestellt. Pflanzenzellwände sowie tote Pflanzenzellen wurden mit PPI visualisiert und sind in rot dargestellt. Die Färbung ist hauptsächlich in der Nähe von Leitbündeln ausgeprägt. **A-C:** Intrazellulär proliferierende Hyphen nach SG200 Infektion (1, 2 und 4 dpi). **D-F:** Extrazellulär wachsende Hyphen von SG200 $\Delta$ stp1 penetrieren Maisepidermiszellen und lösen Akkumulationen von PPI an der Penetrationsstelle sowie in umgebenden Epidermiszellen aus (1 dpi). **G:** Kollabierte extrazelluläre Hyphen sowie eine intrazelluläre Hyphe, die weiter in das Gewebe einwächst und dann arretiert (2 dpi). Ausgefüllte Pfeile deuten auf Appressorien, leere Pfeile auf *on planta* Hyphen. Bei allen Bildern handelt es sich um konfokale „Z-stacks“<sup>1</sup>. Der Größenmaßstab beträgt 25  $\mu$ m.

<sup>1</sup> Bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie kann durch einen Stellmotor das Objekt in Richtung des Strahlenganges (Z-Richtung) bewegt werden. So kann eine Serie mikroskopischer Bilder in der Z-Ebene aufgenommen werden, die für einen räumlichen Überblick überlagert werden („Z-stack“) und so nicht nur einen optischen Querschnitt des Objektes abbilden, sondern einen in die Tiefe reichenden Blick auf das Objekt erlauben.



Die mikroskopische Analyse infizierter Maisblätter nach Färbung mit WGA-AF488/PPI bestätigte die durch Chlorazol Black E-Färbung gewonnenen Ergebnisse: auch hier konnte in der Regel ein sofortiger Arrest der SG200 $\Delta$ stp1 Penetrationshyphen in der ersten Epidermiszelle beobachtet werden, wohingegen SG200 Hyphen sich schon nach wenigen Tagen im Pflanzengewebe ausgebreitet hatten (Abb. 18). Zudem fiel auf, dass die Penetration der *stp1* Deletionsmutante mit einer starken PPI-Färbung der penetrierten Zelle einherging (Abb. 18). In SG200 Infektionen konnte dies nicht beobachtet werden. Da in einer vitalen Zelle der Farbstoff nicht aufgenommen werden kann, deutete eine solch starke Färbung der Pflanzenzelle auf eine gestörte Zellintegrität hin, die durch die Penetration von SG200 $\Delta$ stp1 verursacht wurde.

## **2.4 Charakterisierung der Pflanzenreaktion nach Infektion mit *stp1* Deletionsstämmen**

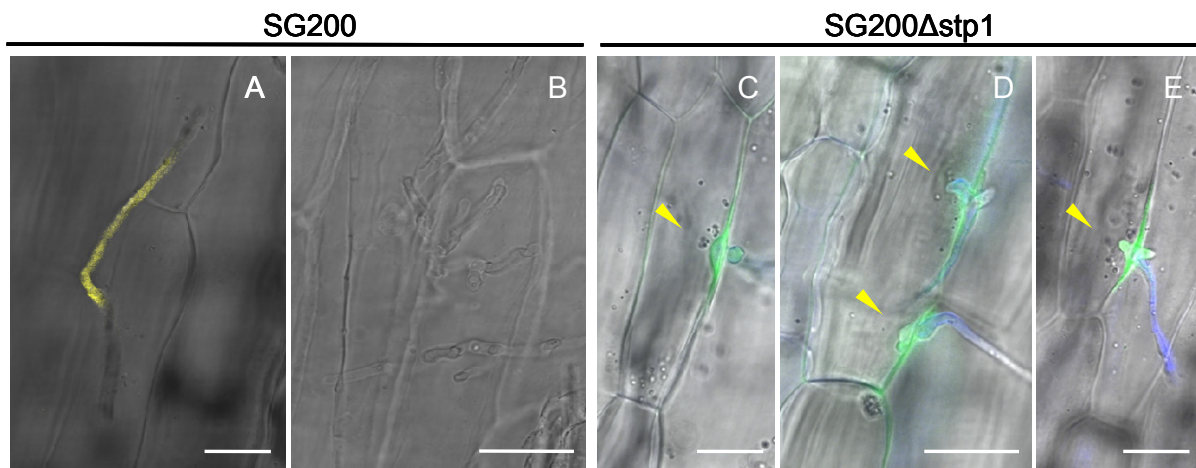
Die bisherigen Untersuchungen legten nahe, dass SG200 $\Delta$ stp1 eine verstärkte Abwehrreaktion der Pflanzenzellen induziert, die normalerweise erfolgreich vom Pilz supprimiert wird (Doehlemann *et al.*, 2008b). Um die vermutete Abwehrreaktion näher zu charakterisieren, wurde infiziertes Maisgewebe mikroskopisch genauer untersucht. Dabei wurden auch verschiedene Färbungen, die Einblick in den Zustand infizierter Pflanzenzellen geben sollten, eingesetzt. Die Reaktion von Maispflanzen auf eine Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 im Vergleich zur SG200 Infektion wurde zudem durch Transkriptomanalysen auf globaler Ebene analysiert.

### **2.4.1 Detektion von Autofluoreszenz und Papillenbildung nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1**

Pflanzliche Abwehrreaktionen gehen häufig mit verstärkt auftretender Autofluoreszenz einher. Diese entsteht wahrscheinlich vorwiegend durch die Akkumulation phenolischer Substanzen sowie Zellwandappositionen wie Callose und Lignin (Chen and Schopfer, 1999). Daher wurde mit SG200 $\Delta$ stp1 infiziertes Maisgewebe auf Autofluoreszenz untersucht. Die durch den UV-Laser angeregte Hintergrundfluoreszenz von Maisgeweben, die mit *U. maydis* infiziert wurden, ist relativ hoch und betrifft hauptsächlich die Zellwände infizierter Maiszellen sowie die Chloroplasten im Mesophyll (Doehlemann *et al.*, 2008a). Nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 (Abb. 19C-E) konnte im Vergleich zu SG200 Infektionen (Abb. 19A/B) eine verstärkte Autofluoreszenz an Penetrationsstellen beobachtet werden. Die Autofluoreszenz war dabei meist auf die umgebende Pflanzenzellwand sowie die

intrazelluläre Penetrationshyphye beschränkt. Seltener konnte Autofluoreszenz der gesamten Pflanzenzellwand infizierter Zellen detektiert werden (Abb. 19D).

Zudem fiel bei diesen Untersuchungen auf, dass an Penetrationsstellen von SG200 $\Delta$ stp1 Pflanzenzellwandablagerungen bzw. -verdickungen gebildet wurden. Diese Papillen wiesen ebenfalls eine starke Autofluoreszenz auf und konnten in SG200 Infektionen nicht identifiziert werden (Abb. 19C/D). In Anilin Blau-Färbungen, durch die Callose-Ablagerungen detektiert werden können, zeigten die Appositionen keine auffällige Färbung, so dass es sich wahrscheinlich um andere fluoreszente sekundäre Depositionen wie etwa Lignin handelte (nicht gezeigt). Die Pathogen-induzierte lokale Papillenbildung sowie die verstärkte Autofluoreszenz deuteten darauf hin, dass die *stp1* Deletionsmutante eine Resistenzreaktion in der Maispflanze auslöst.



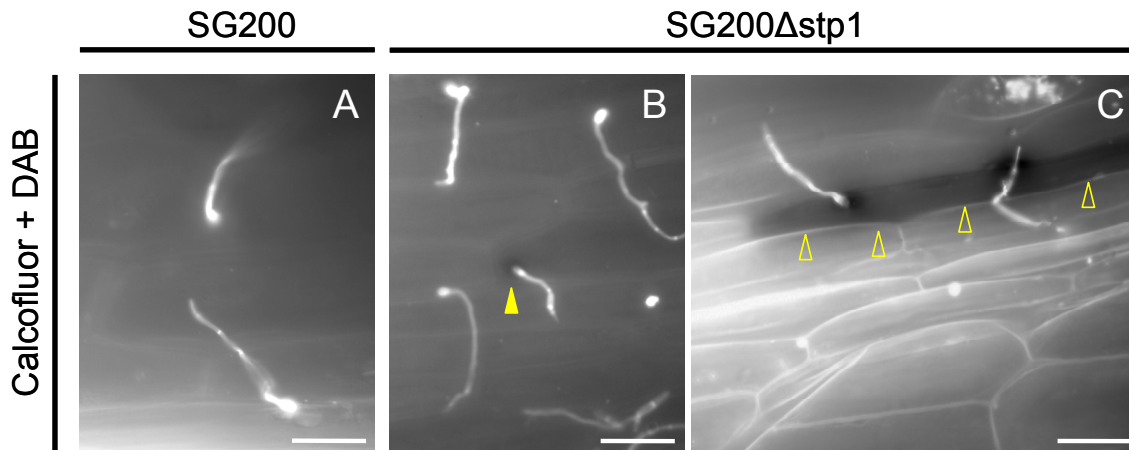
**Abb. 19: Autofluoreszenz und Papillenbildung nach Infektion mit der *stp1* Deletionsmutante.** Die Bilder wurden einen Tag nach Infektion mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie aufgenommen und zeigen durch UV-Licht angeregte starke Autofluoreszenz (grün). Das Mikroskop wurde so eingestellt, dass die Hintergrundfluoreszenz der infizierten Maispflanzen nicht detektiert wurde. *On planta* Pilzhypen wurden zusätzlich mit Calcofluor White angefärbt (gelb in SG200; blau in SG200 $\Delta$ stp1). Im Gegensatz zu SG200 Infektionen (A/B) konnte in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen (C-E) Autofluoreszenz (Pfeile) an Penetrationsstellen detektiert werden. Auch die Bildung von Papillen konnte nur in der Mutante beobachtet werden. Die Mutante arretierte meist bereits in dem abgebildeten Stadium. SG200 breitete sich zu diesem Zeitpunkt bereits in der Pflanzenepidermis aus, ohne eine verstärkte Autofluoreszenzreaktion in den infizierten Zellen auszulösen (B). Der Größenstandard entspricht 20  $\mu$ m.

#### 2.4.2 *stp1* Mutanten induzieren eine Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Resistenzreaktion von Pflanzen gehen häufig mit einer verstärkten Produktion von Peroxidasen, Phenolen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einher (Von Röpenack *et al.* 1998; Hückelhoven *et al.* 1999). Um dies zu testen, wurden infizierte Blätter mit Diaminobenzidin (DAB) angefärbt (Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Fryer *et al.*, 2002; Abb. 20).

DAB bildet in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein braunes Präzipitat. In SG200 Infektionen konnte zu keinem Zeitpunkt ein eindeutiges braunes DAB-Präzipitat in Assoziation mit Pilzhypen

detektiert werden (Abb. 20A und nicht gezeigt). In Pflanzen, die mit SG200 $\Delta$ stp1 infiziert worden waren, konnte dagegen bereits am ersten Tag nach der Infektion eine eindeutige Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet werden. Das braune DAB-Präzipitat akkumulierte spezifisch an Penetrationsstellen, sowie manchmal in der gesamten attackierten Pflanzenzelle (Abb. 20C). Bereiche, in denen besonders viele Epidermiszellen penetriert wurden, wiesen eine besonders ausgeprägte Färbung auf (nicht gezeigt).

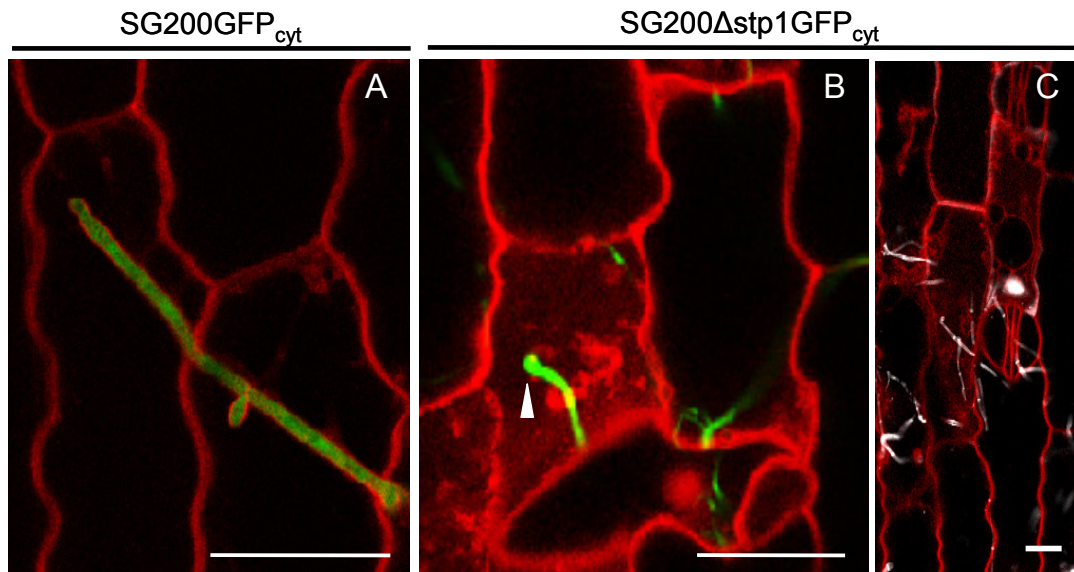


**Abb. 20: Diaminobenzidin-Färbung von infiziertem Maisgewebe.** Die Abbildungen zeigen *U. maydis* Hyphen auf der Pflanzenoberfläche nach Calcofluor White und Diaminobenzidin- (DAB) Färbung (1 dpi). In **A** ist eine Infektion mit SG200, in **B** und **C** SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen dargestellt. Das in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildete Präzipitat erscheint im Fluoreszenzkanal dunkel (**B/C**; Pfeile). Der Größenstandard entspricht 20  $\mu$ m.

### 2.4.3 *stp1* Mutanten induzieren einen Apoptose-ähnlichem Zelltod

Eine weit verbreitete Resistenzreaktion im Zuge einer inkompatiblen Interaktion ist das schnelle Absterben infizierter Zellen, das durch eine hypersensitive Reaktion ausgelöst wird (Stakman, 1915). Mit Hilfe einer FM4-64 Färbung infizierter Maisblätter wurde überprüft, ob durch Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 ein hypersensitiver Zelltod in Maiszellen induziert wird. Mit dem Farbstoff FM4-64 können Pilz- und Pflanzenmembranen durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie visualisiert werden (Kankanala *et al.*, 2007). Für die parallele Detektion von vitalen Pilzhyphen wurden Stämme verwendet, die konstitutiv cytoplasmatisches GFP exprimieren (SG200GFP<sub>cyt</sub> und SG200 $\Delta$ stp1GFP<sub>cyt</sub>; Abb. 21). Nach SG200 Infektion konnte mit FM4-64 ein normales intrazelluläres Wachstum GFP-akkumulierender Pilzhyphen beobachtet werden. Die Pflanzenzellmembran lokalisierte wie erwartet an der Zellperipherie und ummantelte die Pilzhyphen. In SG200 $\Delta$ stp1 penetrierten Maiszellen konnte dagegen nach 24 Stunden eine starke intrazelluläre Vesikelbildung beobachtet werden und die Cytoplasmamembran erschien desintegriert (Abb. 21B/C). Derartige Merkmale können typischerweise in apoptotischen Zellen beobachtet werden und

waren daher ein weiteres Indiz für eine hypersensitive Antwort auf die Infektion mit der *stp1* Deletionsmutante. Bereits zwei Tage nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1GFP<sub>cyt</sub> konnte in den Pilzhypen keine GFP-Fluoreszenz mehr detektiert werden, obwohl durch Calcofluor White die Präsenz von Hyphen bestätigt werden konnte (Abb. 21C). In SG200 Infektionen konnten ebenfalls vereinzelt apoptotische Zellen mit multiplen Vesikeln beobachtet werden (nicht gezeigt), jedoch war die Frequenz hier um ein Vielfaches geringer (vgl. auch Doehlemann *et al.*, 2008b).



**Abb. 21: FM4-64 Färbung zur Detektion von apoptotischem Gewebe in SG200 $\Delta$ stp1 infizierten Maispflanzen.** A: Querschnitt durch die Epidermis nach Infektion mit SG200GFP<sub>cyt</sub> (24 hpi). B: Aufsicht auf die Pflanzenoberfläche nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1GFP<sub>cyt</sub> (24 hpi). C: Übersicht auf Blattoberfläche nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1GFP<sub>cyt</sub>. Die Hyphen zeigten keine GFP-Fluoreszenz mehr und wurden daher mit Calcofluor White gegengefärbt (48 hpi). Der weiße Pfeil zeigt ein Appressorium. Der Größenstandard entspricht 20  $\mu$ m.

#### 2.4.4 Transkriptomanalysen von mit SG200 $\Delta$ stp1 infizierten Maispflanzen

Um ein globaleres Bild von der durch SG200 $\Delta$ stp1 induzierten Abwehrreaktion zu erhalten, wurden Transkriptionsanalysen infizierter Maispflanzen mit Hilfe von Affymetrix Maisgenom-Microarrays durchgeführt. Zum Abgleich der Ergebnisse mit kompatiblen *U. maydis* Infektionen konnte auf eine bereits publizierte umfangreiche Transkriptomanalyse von Maispflanzen nach SG200 Infektion zurückgegriffen werden (Doehlemann *et al.*, 2008b). Für die Probennahme für die Mais-Microarrays nach SG200 $\Delta$ stp1 Infektion wurden mit zwölf und 24 Stunden nach Infektion frühe Infektionsstadien gewählt, da es bereits nach etwa 24 Stunden zum Arrest der *stp1* Deletionsmutante kommt (vgl. 2.3.2) und zu späteren Zeitpunkten daher zu große Differenzen im Genexpressionsmuster zu erwarten waren. Für die

statistisch abgesicherte Auswertung der Microarrays wurden drei biologische Replikate von beiden Zeitpunkten angefertigt.

**Tabelle 1: Im Vergleich zu SG200 Infektionen differenziell regulierte Maisgene nach 12 hpi.**

probe set	Funktion/Annotation <sup>1</sup>	Accession <sup>2</sup>	Expressions- änderung
Zm.5749.1.S1_at	Pirin-ähnliches Protein	CK347277	6,5
Zm.875.2.A1_at	RING-Finger Protein	AI668449	5,98
Zm.2541.1.A1_at	Prolin-reiches Protein	CF629797	4,34
Zm.125.1.S1_at	Nitrat Reduktase	X64446.1	4,28
Zm.5973.1.S1_at	Osmotin-ähnliches Protein	CF636776	3,95
Zm.17666.1.A1_at	Zink-Finger Homeodomänen Protein	CF635462	3,83
Zm.7150.3.A1_a_at	unbekanntes Protein	AY109249.1	3,76
Zm.11837.1.A1_at	Polyphenol-Oxidase	BM381140	2,79
Zm.18478.1.S1_at	putativer Transkriptionsfaktor	CO521952	2,78
Zm.9490.1.A1_at	ähnlich zum Transkriptionsfaktor SOX-14 ( <i>A. thaliana</i> )	BM381005	2,54
Zm.5108.1.A1_at	Xyloglucan Endotransglukosylase/Hydrolase	AI600869	2,47
Zm.17498.1.A1_at	ähnlich zur Kinase TMKL1 ( <i>A. thaliana</i> )	CK144816	2,31
ZmAffx.715.1.A1_s_at	unbekanntes Protein	AI739762	-2,49
Zm.6234.2.S1_at	Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1)	AI881460	-2,57
Zm.3225.1.S1_at	GATA Transkriptionsfaktor	BE512131	-2,63
Zm.551.1.A1_at	putative Glutathion S-Transferase	CF626259	-2,76
ZmAffx.736.2.A1_at	unbekanntes Protein	AW355861	-2,78
Zm.301.1.A1_a_at	Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor	BM334689	-2,89
Zm.6977.5.S1_a_at	Saccharose-Synthase	AI881652	-3,24
ZmAffx.1156.1.S1_s_at	unbekanntes Protein	AW433382	-3,26
Zm.201.1.S1_at	basische Endochitinase	L16798.1	-3,58
Zm.14845.1.S1_at	Latrophilin-1	AY106843.1	-3,6
Zm.7031.1.A1_at	putative Serin/Threonin-Proteinkinase	CO532209	-3,67
Zm.15278.1.S1_at	putativer Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor	BM380074	-3,79
Zm.3687.1.A1_at	putative Serine/Threonin-Proteinkinase	AW042269	-3,96
Zm.5796.1.A1_at	Elongationsfaktor G	BM332299	-4,03
Zm.19066.1.S1_at	ähnlich zur Glutamat-Decarboxylase 1 ( <i>O. sativa</i> )	CD975063	-4,04
Zm.9034.1.A1_at	Bowman-Birk Trypsin Inhibitor	BM382058	-4,37
Zm.18453.1.A1_at	Caspase/Cystein Endopeptidase	CO523307	-4,48
Zm.7385.1.A1_at	ähnlich zu S-Adenosyl-L- Methionin:Salicylat-Carboxyl Methyltransferase ( <i>O. sativa</i> )	CF626198	-4,83
Zm.299.1.S1_a_at	Malat-Synthase	L35914.1	-5,49
Zm.8726.1.A1_at	Thaumatococcus-ähnliches Protein	BM266883	-6,47
Zm.12518.1.A1_at	Germin-ähnliches Protein	CA452751	-9,81
Zm.389.1.S1_at	unbekanntes Protein	AF233881.1	-13,09
Zm.2793.1.A1_at	putative Aldehyd-Dehydrogenase	AF348417.1	-16,14

<sup>1</sup> Die Annotation wurde aufgrund von BLAST Ergebnissen ermittelt

<sup>2</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucst>

Zwölf Stunden nach Infektion war in SG200 Infektionen die Induktion vieler Stress-assoziiertes Gene beobachtet worden. Die Mehrheit dieser induzierten Gene kodierte für PR-

Proteine. Diese Reaktion der Pflanze verdeutlicht, dass *U. maydis* erkannt wird und eine PAMP-vermittelte Abwehrreaktion auslöst (Doehlemaun *et al.*, 2008b). Die Transkriptomanalyse von Maispflanzen nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 ergab zwölf Stunden nach Inokulation ein sehr ähnliches Bild: Nur 35 Gene waren im Vergleich zu SG200 infizierten Pflanzen signifikant differenziell reguliert (fold change  $\geq 2$ ; Tabelle 1).

Die weitere Analyse des Maistranskriptoms 24 Stunden nach einer SG200 Infektion hatte verdeutlicht, dass *U. maydis* die nach zwölf Stunden beobachtete Abwehrreaktion erfolgreich supprimieren kann (Doehlemaun *et al.*, 2008b). 37 Abwehr-assoziierte Gene, die nach zwölf Stunden in infiziertem Gewebe stark induziert waren, werden nach 24 Stunden wieder reprimiert. In den in dieser Arbeit durchgeführten Microarrays waren 24 Stunden nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 124 Pflanzengene im Vergleich zu SG200 Infektionen signifikant differenziell reguliert (fold change  $\geq 2$ ; Tabelle 2).

**Tabelle 2: Im Vergleich zu SG200 Infektionen differenziell regulierte Maisgene nach 24 hpi<sup>1</sup>.**

probe set	Funktion/Annotation <sup>2</sup>	Accession <sup>3</sup>	Expressions- änderung
Zm.9636.1.A1_at	Wir1A Protein	BM349325	12,65
Zm.791.1.S1_s_at	Wuglu (beta-1,3-Glukanase)	AY111675.1	10,11
Zm.16805.8.S1_at	Endochitinase	BG837630	9,35
Zm.15827.1.A1_at	unbekanntes Protein	CK370003	8,05
Zm.17916.1.S1_at	hypothetisches Protein	CF633017	7,26
Zm.864.1.S1_at	putative Glutathion S-Transferase	AF244695.1	6,89
Zm.14496.1.A1_at	Terpen-Synthase/Cyclase	CF014750	6,46
Zm.16805.3.S1_a_at	unbekanntes Protein	BM381902	6,42
Zm.12208.1.A1_at	putatives Cytochrom P450	BM736144	6,37
Zm.10830.1.S1_at	Homolog zu Serk3/Bak1 aus <i>A. thaliana</i>	CF028241	6,19
Zm.16272.1.A1_at	Glutamat-Cystein Ligase	CF028346	6,07
ZmAfx.1198.1.A1_at	unbekanntes Protein	BE056195	6,02
Zm.10003.1.A1_at	ähnlich zu humanem Apoptose-assoziiertem nuclearem Protein	BM379977	5,72
Zm.8726.1.A1_at	Thaumatol-ähnliches Protein	BM266883	5,71
Zm.281.1.S1_at	Osmotin-ähnliches Protein	U06831.1	5,47
Zm.1871.1.A1_at	unbekanntes Protein	BM338644	5,22
Zm.2136.1.S1_at	Peroxidase 12	AW282383	5,2
Zm.3568.1.A1_at	putatives Membranprotein	BM080500	4,95
Zm.3568.2.A1_a_at	unbekanntes Protein	CF629788	4,93
Zm.8864.1.A1_s_at	unbekanntes Protein	BM269430	4,85
Zm.4089.1.S1_at	Hexose-Transporter	AY108577.1	4,81
Zm.13583.1.S1_at	sekretiertes Protein	AY108161.1	4,8
Zm.1506.1.A1_at	Hevein-ähnliches Protein	X82184.1	4,76
Zm.4202.1.A1_at	<i>Phytophthora infestans</i> Resistenzprotein R1B-12	CB350777	4,63
Zm.14226.1.A1_at	Cytochrom P450	BM337251	4,62
Zm.14951.1.S1_a_at	Zellwandprotein	M36914.1	4,57
Zm.11758.1.A1_at	putative Flavonol-Synthase/Flavanone 3-Hydroxylase	CF028197	4,56

Zm.8714.1.A1_at	unbekanntes Protein	AY359573.1	4,55
Zm.187.1.S1_at	Peroxidase 12	CK370048	4,48
Zm.14951.1.S1_x_at	Zellwandprotein	M36914.1	4,38
Zm.10091.1.A1_at	Splicing Faktor	BM382104	4,38
Zm.10674.1.A1_at	$\beta$ -1,3-Galactosyltransferase	BM380580	4,37
Zm.2926.1.A1_at	Calmodulin-ähnliches Protein 1	CF630141	4,26
Zm.10101.1.A1_at	putativer Polygalacturonase Inhibitor	BM379606	4,26
Zm.1450.1.S1_at	unbekanntes Protein	BM337200	4,24
Zm.7489.1.A1_at	ähnlich zur Serin/Threonin-Proteinkinase PBS1 (AvrPphB susceptible protein 1)	BM078668	4,17
Zm.17203.1.A1_at	putatives Kernmembranprotein	CF631632	4,16
Zm.4882.2.S1_at	Ornithin-Carbamoyltransferase	CK985806	4,13
Zm.9601.1.A1_at	Uroporphyrinogen-Decarboxylase	BM339800	4,05
Zm.1956.1.S1_at	Nuclease Untereinheit	BM073956	4,05
Zm.4596.1.A1_at	putative Lipoxygenase	CF636987	4
Zm.14951.2.S1_x_at	Zellwandprotein	BG837389	3,95
Zm.9297.1.A1_at	putatives RING-Finger Protein	CD998185	3,88
Zm.10103.1.A1_at	hypothetisches Protein	AI947611	3,82
Zm.6659.1.A1_at	Osmotin-ähnliches Protein	BM075306	3,81
Zm.281.1.S1_s_at	antifungales Zeamatin-ähnliches Protein	U06831.1	3,76
Zm.11141.1.S1_at	Ammonium-Transporter	AY106810.1	3,76
Zm.12900.1.S1_at	putative Serin/Threonin-Rezeptorkinase	CA401269	3,75
Zm.12550.1.A1_at	putative Serin/Threonin-Proteinkinase	BM380224	3,56
Zm.11852.1.A1_x_at	hypothetisches Protein	CF013366	3,54
Zm.2005.1.A1_at	FIERG1-Homolog ( <i>O. sativa</i> )	BM379246	3,53
Zm.18148.1.A1_at	unbekanntes Protein	CN844779	3,41
Zm.555.1.S1_at	Glutathion S-Transferase	AF244694.1	3,38
Zm.9942.1.A1_at	Serin/Threonin-Protein Phosphatase	CK368883	3,33
Zm.10177.1.A1_at	Aldehyd-Dehydrogenase	BM382782	3,29
Zm.7998.1.A1_at	putative Mannitol-Dehydrogenase	AY106482.1	3,25
Zm.7654.1.A1_at	putatives Protein der Ergosterol-Biosynthese	BG874072	3,23
Zm.10175.1.A1_at	unbekanntes Protein	BM379420	3,2
Zm.13065.1.A1_at	putative Sarcosin-Oxidase	CD437453	3,03
Zm.9486.1.A1_at	hypothetisches Protein	CK347877	2,99
Zm.11804.1.A1_s_at	Ähnlich zum Monosaccharid-Transporter STP4 ( <i>A. thaliana</i> )	BM380880	2,99
Zm.16805.3.S1_x_at	unbekanntes Protein	BM381902	2,97
Zm.12118.1.A1_at	ähnlich zu humanem Progesteron-Rezeptor	BQ034341	2,96
Zm.18147.1.S1_at	Putatives Membranprotein	CN845526	2,96
Zm.12293.1.S1_at	Bax Inhibitor 1 (BI-1)	CN844282	2,89
Zm.7659.1.S1_at	Phosphat-Transporter	AY639019.1	2,84
Zm.11691.1.A1_at	Caskin-1 (CASK-interagierendes Protein 1)	BM379957	2,69
Zm.17266.1.A1_at	DNAJ Hitzeschockprotein	CF245152	2,68
Zm.2233.1.A1_at	Kalium-Transporter	CO527146	2,66
Zm.2482.1.A1_at	Hitzeschock-Protein (Hsp11)	BM333007	2,53
Zm.16832.1.A1_at	putative Zuckerkinase	CD968014	2,42
Zm.708.1.A1_at	Phenylalanin-Ammoniumlyase 2 (PAL2)	AW563057	2,39
Zm.7012.12.S1_a_at	ribosomales Protein	AI691869	-2,3
ZmAfx.715.1.A1_s_at	unbekanntes Protein	AI739762	-2,36
Zm.127.3.S1_at	unbekanntes Protein	AI677333	-2,43
Zm.5570.1.A1_at	Nucleotid-Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase	CF646219	-2,71
Zm.12109.1.S1_at	unbekanntes Protein	BU050562	-2,73
ZmAfx.518.1.S1_at	unbekanntes Protein	AI711603	-2,77
Zm.7289.1.A1_at	chloroplastidäres, ribosomales Protein	AY108103.1	-2,79
Zm.8176.1.A1_a_at	unbekanntes Protein	AY107848.1	-2,9

ZmAffx.1156.1.S1_s_at	unbekanntes Protein	AW433382	-2,9
Zm.14272.5.S1_x_at	Cystatin-ähnliches Protein	BG841472	-2,92
Zm.5319.1.S1_a_at	unbekanntes Protein	AY103567.1	-2,94
Zm.31.2.A1_a_at	unbekanntes Protein	AY109335.1	-3,1
Zm.3687.1.A1_at	putative Serin/Threonin-Proteinkinase	AW042269	-3,11
Zm.334.1.S1_at	„major intrinsic family“ Protein	AF326489.1	-3,13
Zm.8016.1.A1_at	unbekanntes Protein	BI992016	-3,14
Zm.445.1.S1_at	putative Lipoxygenase 3	AF329371.1	-3,17
ZmAffx.1455.1.S1_at	unbekanntes chloroplastidäres Protein	11990232-22	-3,19
Zm.3303.2.A1_at	Lipoxygenase 2	CO527646	-3,31
Zm.16958.3.S1_a_at	unbekanntes Protein	CO528527	-3,32
Zm.17180.1.A1_at	Homolog zum TRANSPARENT TESTA 12 Protein ( <i>A. thaliana</i> )	CK368433	-3,34
Zm.18039.1.A1_at	putative Lipase	CK985952	-3,36
Zm.8900.2.S1_at	ribosomales Protein	AI759040	-3,39
Zm.17224.1.S1_s_at	unbekanntes Protein	BM500725	-3,4
Zm.551.1.A1_at	Glutathion S-Transferase	CF626259	-3,54
Zm.1567.1.S1_at	putative Mannitol-Dehydrogenase	BG840795	-3,56
Zm.18284.1.A1_at	putative Acetyltransferase	BG873939	-3,8
Zm.4324.1.A1_at	Anter-spezifisches Prolin-reiches Protein	CO524609	-3,85
Zm.17589.1.A1_at	unbekanntes Protein	CK144401	-4,06
Zm.18233.1.S1_at	Calcium-abhängige Proteinkinase	CN845506	-4,07
Zm.3634.1.A1_at	Jasmonat-induziertes Protein	CF638013	-4,09
Zm.5796.1.A1_at	Elongationsfaktor G	BM332299	-4,4
Zm.14138.1.A1_at	unbekanntes Protein	U75531.1	-4,96
Zm.6578.1.A1_at	Lipase	BG841096	-5,13
Zm.4909.1.A1_at	D-Cadinen Synthase	AY111633.1	-5,16
Zm.10120.1.A1_at	basisches Helix-Loop-Helix Protein	BM380514	-5,82
Zm.14845.1.S1_at	Latrophilin-1	AY106843.1	-6,24
Zm.201.1.S1_at	basische Endochitinase	L16798.1	-6,63
Zm.3303.1.A1_at	Lipoxygenase (LOX1)	AF271894.1	-7,03
Zm.12584.5.A1_at	Serin/Arginin repetitives Matrixprotein	CD573027	-7,16
Zm.3303.1.A1_x_at	Lipoxygenase	AF271894.1	-7,49
Zm.446.1.S1_at	Ent-Kauren-Synthase	AF529266.1	-7,5
Zm.17301.1.A1_at	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase	CF624899	-8,17
Zm.3384.1.A1_x_at	unbekanntes Protein	BI319306	-10,22
Zm.9574.1.A1_at	unbekanntes Protein	BM332377	-11,43
Zm.8113.1.S1_at	Cysteinproteinase-Inhibitor (Cystatin)	BM072984	-11,47
Zm.3384.1.A1_a_at	unbekanntes Protein	BI319306	-11,48
Zm.7385.1.A1_at	Benzoat-Carboxyl Methyltransferase	CF626198	-11,63
Zm.15278.1.S1_at	Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor-2A	BM380074	-13,07
Zm.783.1.S1_at	Sirohydrochlorin-Ferrochelatase	AY105282.1	-13,31
Zm.389.1.S1_at	unbekanntes Protein	AF233881.1	-13,6
Zm.9034.1.A1_at	Bowman-Birk Trypsin Inhibitor	BM382058	-40,27
Zm.16580.1.A1_at	Bowman-Birk Trypsin Inhibitor	BM380261	-129,31

<sup>1</sup> Die mit verschiedenen Farben markierten Proteine werden im Text näher erläutert.

<sup>2</sup> Die Annotation wurde aufgrund von BLAST Ergebnissen ermittelt.

<sup>3</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

Auffälligerweise konnte die in SG200 Infektionen beobachtete Suppression früh induzierter, Abwehr-assoziiierter Maisgene hier nicht beobachtet werden (Tabelle 3). 24 der 37 Abwehr-assoziierten Gene, die in Infektionen mit SG200 nach 24 Stunden reprimiert werden, waren



24 Stunden nach SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen nach wie vor stark induziert. Vier dieser Gene gehörten zu den am höchsten induzierten Genen im Vergleich zur SG200 Infektion und kodierten für ein WirA protein (Zm.9636.1.A1\_at), eine Beta-1,3-Glucanase (Zm.791.1.S1\_s\_at), sowie für zwei Proteine unbekannter Funktion (Zm.15827.1.A1\_at; Zm.17916.1.S1\_at) (Tabelle 2 u. 3; rote Markierung).

**Tabelle 3: Pflanzenabwehr-assoziierte Gene, die nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 im Gegensatz zu SG200 Infektionen nicht reprimiert werden<sup>1</sup>.**

Probe set	Funktion/Annotation <sup>2</sup>	Accession <sup>3</sup>	Induktion
Zm.9636.1.A1_at	Wir1A Protein	BM349325	12.65
Zm.791.1.S1_s_at	Wuglu (Beta-1,3-Glucanase)	AY111675.1	10.11
Zm.15827.1.A1_at	unbekanntes Protein ( <i>O. sativa</i> )	CK370003	8.05
Zm.17916.1.S1_at	hypothetisches Protein	CF633017	7.26
Zm.864.1.S1_at	putative Glutathion S-Transferase	AF244695.1	6.89
Zm.14496.1.A1_at	Terpen Synthase/Cyclase	CF014750	6.46
Zm.12208.1.A1_at	Cytochrom P450	BM736144	6.37
Zm.16272.1.A1_at	Glutamat-Cystein Ligase	CF028346	6.07
ZmAffx.1198.1.A1_at	Thaumatococcus-ähnliches Protein 5	BE056195	6.02
Zm.10003.1.A1_at	ähnlich zu humanem Apoptose-assoziiertem nuclearem Protein	BM379977	5.72
Zm.8726.1.A1_at	Thaumatococcus-ähnliches Protein	BM266883	5.71
Zm.2136.1.S1_at	Peroxidase 12	AW282383	5.2
Zm.4089.1.S1_at	Hexose Transporter	AY108577.1	4.81
Zm.1506.1.A1_at	Hevein-ähnliches Protein	X82184.1	4.76
Zm.4202.1.A1_at	<i>Phytophthora infestans</i> Resistenzprotein R1B-12	CB350777	4.63
Zm.14226.1.A1_at	Cytochrom P450	BM337251	4.62
Zm.8714.1.A1_at	unbekanntes Protein	AY359573.1	4.55
Zm.10101.1.A1_at	Polygalacturonase-Inhibitor	BM379606	4.26
Zm.1450.1.S1_at	unbekanntes Protein	BM337200	4.24
Zm.1956.1.S1_at	Nuklease Untereinheit	BM073956	4.05
Zm.4596.1.A1_at	putative Lipxygenase	CF636987	4
Zm.9297.1.A1_at	RING-Finger Protein	CD998185	3.88
Zm.10177.1.A1_at	Aldehyd Dehydrogenase	BM382782	3.29
Zm.7654.1.A1_at	putatives Protein der Ergosterol-Biosynthese	BG874072	3.23

<sup>1</sup> Die Liste stellt Abwehr-assoziierte Gene aus *Z. mays* dar, die im frühen Verlauf von *U. maydis* Infektionen kurzfristig induziert (12 hpi) und in SG200, nicht aber in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen nach 24 Stunden wieder reprimiert werden (Doehlemann *et al.*, 2008b). Die rot markierten Proteine werden im Text näher erläutert.

<sup>2</sup> Die Annotation wurde aufgrund von BLAST Ergebnissen ermittelt.

<sup>3</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

Zudem konnte 24 Stunden nach SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen die Induktion vieler Gene beobachtet werden, die für unbekannte Proteine kodierten, häufig Zellwand- oder Membran-assoziiert waren und in SG200 Infektionen nicht hochreguliert wurden. Auffällig war auch, dass die Expression mehrerer Serin-Threonin Rezeptorkinasen und anderer Rezeptoren induziert wurde (vgl. Tabelle 2; grüne Markierung). Die im Vergleich zur SG200 Infektion

am stärksten reprimierten Gene kodierten für verschiedene Proteaseinhibitoren, wie Bowman-Birk-Trypsin Inhibitoren (Zm.9034.1.A1\_at; Zm.16580.A1\_at), einen Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor (Zm.15278.1.S1\_at) sowie den Cystein-Proteaseinhibitor Cystatin (Zm.8113.1.S1\_at) (Tabelle 2; gelbe Markierung).

In SG200 Infektionen kam es bereits in frühen Infektionsstadien zu einer klaren Induktion des Jasmonat-Signalweges. Dieses ging mit einer Akkumulation von Transkripten für Defensine, Hevein-ähnlichen Proteinen sowie Chitinasen einher (Doehleemann *et al.*, 2008b). Im Gegensatz dazu wurde in Infektionen mit der *stp1* Deletionsmutante nach 24 Stunden die Transkription von Schlüsselgenen des Jasmonatsyntheseweges nicht induziert. So waren beispielsweise vier Lipoxygenasen (Zm.445.2.S1\_at; Zm.3303.2.A1\_at, Zm.3303.1.A1\_at und Zm.3303.1.A1\_x\_at) sowie ein Jasmonat-induzierbares Gen (Zm.3634.1.A1\_at) im Vergleich zur SG200 Infektion nach 24 Stunden reprimiert (Tabelle 2; blaue Markierung).

Um die mit Hilfe der Transkriptomdaten näher definierte Abwehrreaktion der Pflanze noch genauer zu analysieren, wurden die Daten nicht nur mit den in Doehleemann *et al.* (2008b) beschriebenen Daten für SG200 Infektionen, sondern auch mit Microarraydaten aus SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen verglichen (Doehleemann *et al.*, 2009). *U. maydis* pep1 Deletionsstämme sind wie *stp1* Deletionstämme in Pflanzeninfektionen apathogen, können jedoch im Gegensatz zur *stp1* Mutante die Cytoplasmamembran der Pflanze nicht erfolgreich penetrieren. Wie in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen kommt es auch in SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen zu einer verstärkten Abwehrreaktion der Pflanze (Doehleemann *et al.*, 2009). Ein Vergleich der Transkriptomdaten von Pflanzen, die mit SG200 $\Delta$ pep1 infiziert wurden, mit Pflanzen nach SG200 $\Delta$ stp1 Infektion wies im Einklang mit den sich ähnelnden Phänotypen eine große Übereinstimmung auf. Dennoch wurden 24 Stunden nach Infektion 36 Gene identifiziert, die in Infektionen mit SG200 $\Delta$ stp1, jedoch nicht in Infektionen mit SG200 $\Delta$ pep1 im Vergleich zu SG200 Infektionen differenziell reguliert waren (fold change  $\geq$  2; Tabelle 4). 22 dieser Gene waren in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen induziert, nicht aber in SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen. Die am stärksten exprimierten Gene, die nicht in SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen induziert waren, kodierten u. a. für ein Homolog zur Rezeptorkinase Serk3/Bak1 aus *Arabidopsis thaliana* (Zm.10830.1.S1\_at), Taumatin- sowie Osmotin-ähnliche Proteine (Zm.8726.1.A1\_at; Zm.281.1.S1\_at; Zm.6659.1.A1\_at) und ein Resistenzprotein, das für die Interaktion von Kartoffel und *Phytophthora infestans* wichtig ist (Zm.4202.1.A1\_at) (rote Markierung).

**Tabelle 4: Im Vergleich zu SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen differenziell regulierte Maisgene nach SG200 $\Delta$ stp1 Infektion (24 hpi)<sup>1</sup>.**

probe set	Funktion/Annotation <sup>2</sup>	Accession <sup>3</sup>	fold change
Zm.10830.1.S1_at	Homolog zu Serk3/Bak1 aus <i>A. thaliana</i>	CF028241	6.19
Zm.8726.1.A1_at	Thaumatin-ähnliches Protein	BM266883	5.71
Zm.281.1.S1_at	Osmotin-ähnliches Protein	U06831.1	5.47
Zm.8864.1.A1_s_at	unbekanntes Protein	BM269430	4.85
Zm.4202.1.A1_at	<i>Phytophthora infestans</i> Resistenzprotein	CB350777	4.63
Zm.187.1.S1_at	Peroxidase 12	CK370048	4.48
Zm.10091.1.A1_at	Spleicing Faktor	BM382104	4.38
Zm.4882.2.S1_at	Ornithin-Carbamoyltransferase	CK985806	4.13
Zm.6659.1.A1_at	Osmotin-ähnliches Protein	BM075306	3.81
Zm.281.1.S1_s_at	Antifungales Zeamatin-ähnliches Protein	U06831.1	3.76
Zm.12550.1.A1_at	putative Serin/Threonin-Proteinkinase	BM380224	3.56
Zm.18148.1.A1_at	unbekanntes Protein	CN844779	3.41
Zm.555.1.S1_at	Glutathion S-Transferase	AF244694.1	3.38
Zm.10177.1.A1_at	Aldehyd-Dehydrogenase	BM382782	3.29
Zm.7998.1.A1_at	putative Mannitol-Dehydrogenase	AY106482.1	3.25
Zm.10175.1.A1_at	unbekanntes Protein	BM379420	3.2
Zm.9486.1.A1_at	hypothetisches Protein	CK347877	2.99
Zm.16805.3.S1_x_at	unbekanntes Protein	BM381902	2.97
Zm.18147.1.S1_at	hypothetisches Protein	CN845526	2.96
Zm.2233.1.A1_at	Kalium-Transporter	CO527146	2.66
Zm.2482.1.A1_at	Hitzeschock-Protein (Hsp11)	BM333007	2.53
Zm.708.1.A1_at	Phenylalanin-Ammoniumlyase 2 (PAL2)	AW563057	2.39
Zm.7012.12.S1_a_at	ribosomales Protein	AI691869	-2.3
ZmAffx.715.1.A1_s_at	unbekanntes Protein	AI739762	-2.36
Zm.127.3.S1_at	unbekanntes Protein	AI677333	-2.43
Zm.12109.1.S1_at	unbekanntes Protein	BU050562	-2.73
Zm.8176.1.A1_a_at	unbekanntes Protein	AY107848.1	-2.9
ZmAffx.1156.1.S1_s_at	unbekanntes Protein	AW433382	-2.9
Zm.5319.1.S1_a_at	unbekanntes Protein	AY103567.1	-2.94
Zm.3687.1.A1_at	putative Serin/Threonin-Proteinkinase	AW042269	-3.11
Zm.334.1.S1_at	“major intrinsic family” Protein	AF326489.1	-3.13
ZmAffx.1455.1.S1_at	unbekanntes chloroplastidäres Protein	11990232-22	-3.19
Zm.17180.1.A1_at	Homolog zum TESTA TRANSPARENT 12 Protein ( <i>A. thaliana</i> )	CK368433	-3.34
Zm.8900.2.S1_at	ribosomales Protein	AI759040	-3.39
Zm.551.1.A1_at	Glutathion S-Transferase	CF626259	-3.54
Zm.3634.1.A1_at	Jasmonat-induziertes Protein	CF638013	-4.09

<sup>1</sup> Gene, die nach 24 Stunden im Vergleich von SG200 $\Delta$ stp1 und SG200 Infektionen, nicht aber in SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen im Vergleich zu SG200 Infektionen differenziell reguliert werden. Microarraydaten aus Doehleemann *et al.* (2009) wurden dabei mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten verglichen. Die rot markierten Proteine werden im Text näher erläutert.

<sup>2</sup> Die Annotation wurde aufgrund von BLAST Ergebnissen ermittelt.

<sup>3</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

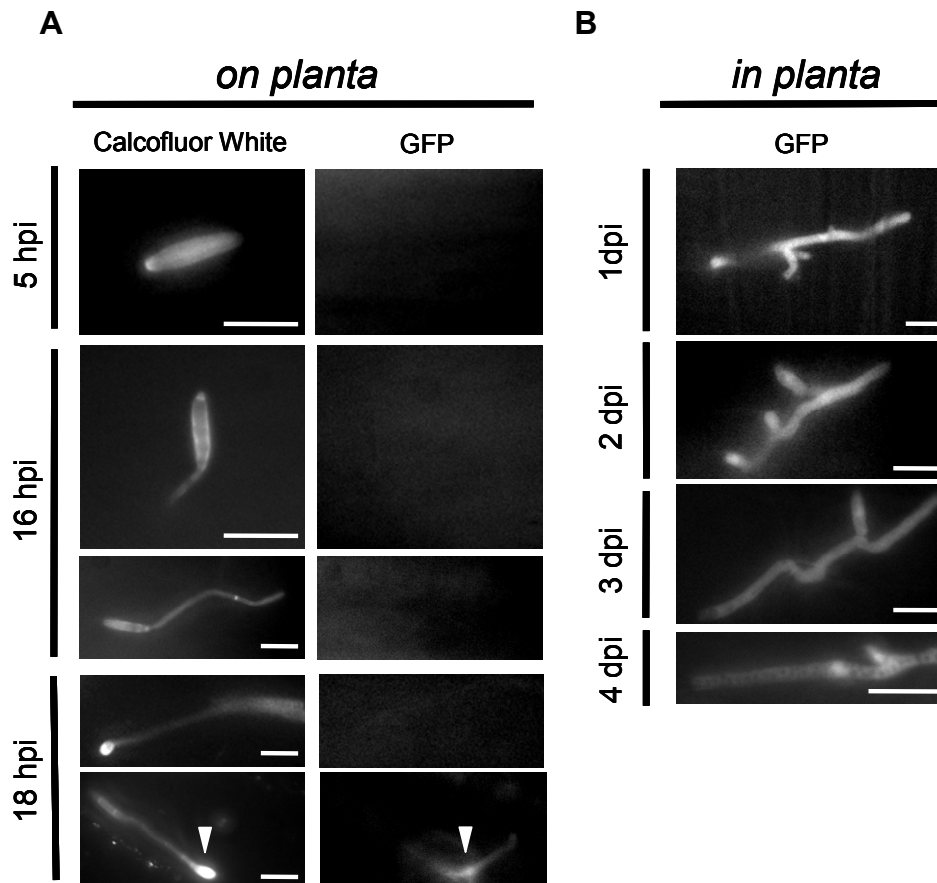
## 2.5 Regulation der *stp1* Expression während des Lebenszyklus von *U. maydis*

Transkriptom-Daten von Tumorgewebe hatten gezeigt, dass *stp1* während der biotrophen Wachstumsphase von *U. maydis* induziert ist (Kämper *et al.*, 2006). Der untersuchte Zeitpunkt betraf ein relativ spätes biotrophes Stadium (5, 9 und 13 dpi). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das *stp1* Gen essentiell für eine erfolgreiche Kolonisierung des Pflanzengewebes direkt nach Penetration von *U. maydis* ist, war vor allem die transkriptionelle Regulation des *stp1* Gens während früher biotropher Stadien interessant. Um Einblick in die *stp1* Expression während und direkt nach der Penetration zu bekommen, wurden zwei komplementäre Techniken angewendet. Zum einen wurde ein Reporterstamm hergestellt, bei dem der endogene *stp1*-Promotor mit *gfp* fusioniert wurde, um anhand cytosolischer GFP-Fluoreszenz die Aktivität des Promotors während des Infektionsverlaufs visualisieren zu können. Außerdem wurde cDNA aus unterschiedlichen Lebenszyklusstadien von *U. maydis* gewonnen und für eine Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR (Q-PCR) eingesetzt. Bei beiden Techniken wurde besondere Aufmerksamkeit auf die frühen Zeitpunkte nach der Infektion (*on planta* Stadium, Penetration und beginnende Proliferation) gelegt. Zudem konnten durch Einbringen eines *stp1* Gens, das unter der Kontrolle des *otef*-Promotors stand, in SG200Δ*stp1* zusätzliche Informationen über die Regulation von *stp1* gewonnen werden.

### 2.5.1 Expressionsanalyse von *stp1* mit Hilfe eines Reporterstammes

Für die Analyse der *stp1* Expression während früher Infektionsphasen wurde der Reporterstamm KS05 verwendet. Dieser enthält ein Konstrukt, bei dem *gfp* an den endogenen *stp1*-Promotor fusioniert wurde. Dies führt bei einsetzender *stp1*-Promotoraktivität zur Akkumulation von cytoplasmatischem GFP. In axenischer Kultur zeigten Sporidien dieses Stammes keine GFP-Fluoreszenz (nicht gezeigt). Nach Infektion von Maispflanzen konnte ebenfalls keine GFP-Akkumulation in Sporidien, Filamenten oder Appressorien-differenzierenden Filamenten auf der Blattoberfläche beobachtet werden (Abb. 22A/rechtes Panel). Um sicherzugehen, dass Sporidien bzw. Filamente in diesen Stadien vorhanden waren, wurden das *on planta* Pilzmaterial mit Calcofluor White gefärbt (Abb. 22A/linkes Panel). Nach 18 Stunden war dagegen in Penetrationshyphen ein schwaches GFP-Signal detektierbar (Abb. 22A). Nach einem Tag war das Signal bereits verstärkt in proliferierenden Pilzhypen in der pflanzlichen Epidermis erkennbar (Abb. 22B). GFP-Fluoreszenz konnte bis zum vierten Tag nach Infektion eindeutig detektiert werden (Abb. 22B), beschränkte sich jedoch weiterhin auf Hyphen in den oberen Gewebeschichten der Pflanze. In Hyphen, die sich

im Mesophyll befanden, war nur in Einzelfällen ein stark abgeschwächtes GFP-Signal sichtbar (nicht darstellbar). Vom fünften Tag nach Infektion an war die Visualisierung von GFP nicht mehr möglich, da zu diesem Zeitpunkt in dem infizierten Gewebe eine sehr starke Autofluoreszenz vorherrschte, die das GFP-Signal überlagerte.



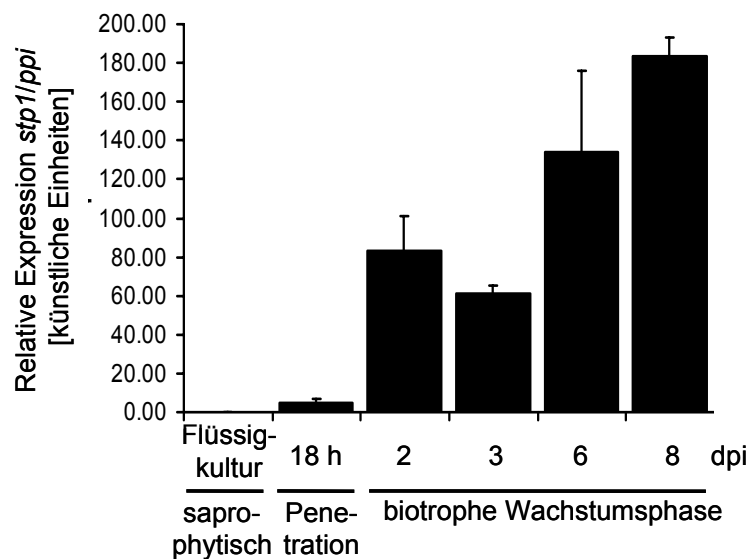
**Abb. 22: *stp1* Expression während verschiedener biotropher Wachstumsstadien.** Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde der Reporterstamm KS05 verwendet, der *gfp* unter der Kontrolle des endogenen *stp1*-Promotors exprimierte. **A:** Zur Visualisierung des Pilzes *on planta* wurde eine Calcofluor White-Färbung durchgeführt. Ein eindeutiges GFP-Signal konnte erst kurz nach Penetration (Pfeil) detektiert werden. **B:** *In planta* konnte zwischen ein und vier Tagen nach Infektion ein starkes GFP-Signal detektiert werden. Spätere Zeitpunkte konnten wegen zu starker Autofluoreszenz nicht analysiert werden. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Mit Hilfe des Reporterstammes konnte gezeigt werden, dass die Expression von *stp1* direkt nach der Penetration der Blattoberfläche einsetzt und noch mindestens vier Tage nach Infektion Pilzhyphen in der Blattepidermis detektierbar ist.

### 2.5.2 Expressionsanalyse von *stp1* mit Hilfe von quantitativer Real-Time PCR

Komplementär zur mikroskopischen Analyse des KS05 Reporterstammes wurde die Expression von *stp1* mittels Q-PCR untersucht. Dazu wurde cDNA aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen von *U. maydis* gewonnen: Saprophytisch wachsende Sporidien wurden in

der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Für einen *on planta* Zeitpunkt (18 Stunden nach Infektion) wurden mittels Flüssiglatexbehandlung Pilzhypen gezielt von der Blattoberfläche infizierter Pflanzen isoliert. Für die cDNA-Gewinnung zu späteren Zeitpunkten des biotropen Wachstums wurden Pflanzenteile mit makroskopisch erkennbaren Infektionssymptomen geerntet (2, 3, 6 und 8 dpi). Als Referenzgen für die Menge eingesetzten Pilzmaterials wurde das *ppi* Gen (Peptidylprolyl-Isomerase) verwendet, das ein konstitutiv exprimiertes Transkript aufweist (Bohlmann, 1996).



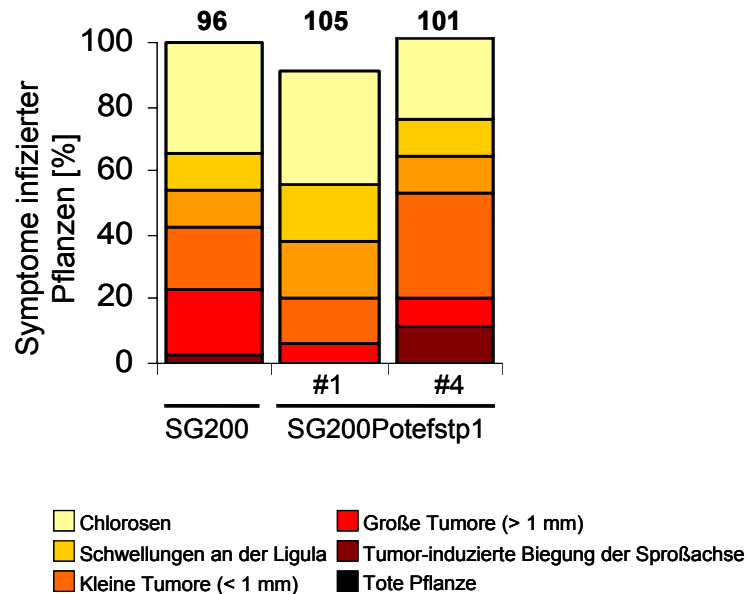
**Abb. 23: Analyse der *stp1* Expression durch Q-PCR.** Die Abbildung zeigt die relative *stp1* Expression im Verhältnis zur Expression des konstitutiv transkribierten *ppi* Gens. Für die Q-PCR wurde RNA aus saprophytisch wachsenden *U. maydis* Zellen (Flüssigkultur), sowie von der Blattoberfläche (18 hpi) und aus infiziertem Pflanzenmaterial (2-8 dpi) gewonnen und in cDNA revers transkribiert. Die Q-PCR wurde in drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten durchgeführt; gezeigt sind die daraus gewonnenen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

In axenischer Kultur konnte kein *stp1* Transkript detektiert werden. 18 Stunden nach Infektion, d. h. zu einem Zeitpunkt, an dem auf der Pflanze wachsende Filamente bereits häufig die Blattoberfläche penetrierten, konnte *stp1* Transkript in geringer Menge nachgewiesen werden. Während späterer Zeitpunkte (2-8 dpi), in denen der Pilz im pflanzlichen Gewebe proliferierte, konnte dagegen durchgehend eine hohe Expression des Gens detektiert werden (Abb. 23).

### 2.5.3 Auswirkung der Expression von *stp1* unter Kontrolle des *otef*-Promotors

Der *otef*-Promotor ist dadurch gekennzeichnet, dass er eine sehr hohe Expression in axenischer Kultur sowie während früher Infektionsstadien von *U. maydis* gewährleistet. Drei bis vier Tage nach Infektion geht die Expression dieses Promotors jedoch stark zurück

(Doehlemann *et al.*, 2008). Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um herauszufinden, wie lange die Expression eines *U. maydis* Gens während der biotrophen Entwicklung erfolgen muss.



**Abb. 24: Virulenz von *stp1* Deletionsmutanten, die mit *P<sub>otef</sub>stp1* komplementiert wurden.** Virulenz von SG200Potefstp1 im Vergleich zum Vorläuferstamm SG200. Dargestellt sind die Boniturdaten zwölf Tage nach Infektion, die aus drei unabhängigen Infektionen ermittelt wurden. Die Gesamtzahl infizierter Pflanzen ist für jede Mutante über der jeweiligen Säule angegeben. Der Stamm SG200Potefstp1#1 zeigte im Southernblot eine einfache, der Stamm #4 eine mehrfache Integration von p123-Potefstp1.

Um zu testen, ob *stp1* vorwiegend in der frühen Infektionsphase oder während des gesamten Infektionsverlaufs essentiell ist, wurde in dem SG200 $\Delta$ *stp1* Stamm das Plasmid p123-Potefstp1 in den *ip*-Lokus eingebracht. Die daraus resultierenden Stämme SG200Potefstp1#1 und #4 wiesen in Maisinfektionen eine mit SG200 vergleichbare bzw. leicht erhöhte Virulenz auf. Es konnten alle Virulenzsymptome bis hin zur Tumorbildung beobachtet werden (Abb. 24). Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass die Bereitstellung von Stp1 während der frühen Infektionsphase ausreicht, um die komplette biotrophe Entwicklung von *U. maydis* zu gewährleisten.

## 2.6 Rekombinante Synthese von Stp1 und Gewinnung polyklonaler Antikörper

Als Voraussetzung für biochemische sowie zellbiologische Arbeiten sollte das Stp1 Protein in einem heterologen System synthetisiert, gereinigt und für die Produktion polyklonaler Antikörper eingesetzt werden. Die Gewinnung spezifischer Antikörper wäre für verschiedenste Experimente vorteilhaft und würde zudem die Problematik möglicher Instabilität oder Funktionsverlust von Stp1-Fusionsproteinen umgehen.

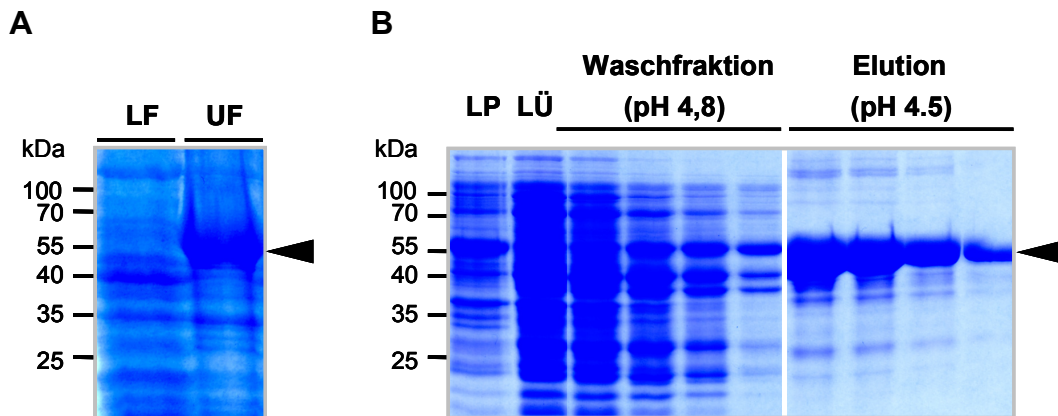
Für die rekombinante Herstellung des Stp1 Proteins ohne N-terminales Signalpeptid und mit einem N-terminalen 6x Histidin-tag (His-Stp1 $\Delta$ N) wurde ein *E. coli* Expressionssystem verwendet. Das gewonnene Protein sollte durch Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dazu wurde das offene Leseraster des *stp1* Gens ohne die Region, die für die ersten 28 Aminosäuren kodiert, in den Expressionsvektor pET15b kloniert (pET15b-stp1 $\Delta$ N). Das Vorhandensein von möglicherweise bioinformatisch nicht detektierbaren Introns wurde zuvor ausgeschlossen, indem die *stp1* cDNA mit genspezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und sequenziert wurde (nicht gezeigt). Das rekombinante Fusionsprotein His-Stp1 $\Delta$ N hatte ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 55 kDa. Die Expression wurde über einen T7-Promotor mit IPTG induziert. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* Rosetta verwendet. Dieser Stamm besitzt tRNAs für fünf seltene Kodons. Da *U. maydis* eine ungewöhnliche Kodon-Nutzung aufweist, könnte das die Translationseffizienz rekombinanten Proteins erhöhen.

In dem *E. coli* Stamm Rosetta/pET15b-stp1 $\Delta$ N konnte His-Stp1 $\Delta$ N erfolgreich in großen Mengen überproduziert werden (Abb. 25). Allerdings gelang es nicht, lösliches Protein in ausreichendem Maße zu synthetisieren. Das His-Stp1 $\Delta$ N Fusionsprotein lag entweder unlöslich in Inklusionskörpern vor oder wurde nicht in ausreichender Menge produziert. Dabei wurden Variable wie die Inkubationstemperatur, IPTG-Konzentration sowie die Induktionsdauer verändert, was jedoch nicht zu dem gewünschten Ergebnis führte (nicht gezeigt).

Auch die Verwendung anderer Expressionssysteme führte zu keiner erfolgreichen Produktion löslichen Stp1 $\Delta$ N Proteins. Da Stp1 zwei Cysteinreste enthält, die möglicherweise eine stabilisierende Disulfidbrücke ausbilden, wurde auch der Expressionstamm *E. coli* Rosetta Gami getestet. In diesem *E. coli* Stamm liegt im Gegensatz zu anderen *E. coli* Stämmen ein reduzierendes Milieu im Cytoplasma vor. In Rosetta Gami/pET15b-stp1 $\Delta$ N konnte trotz Proteaseinhibitorzugabe nur degradiertes Stp1 Protein in geringen Mengen detektiert werden. Auch die Expression durch das IMPACT-TWIN-System, bei dem Stp1 $\Delta$ N an ein Intein mit induzierbarer Autospaltaktivität fusioniert wurde (NEB, Frankfurt a. M.; Southworth *et al.*,



1999), ergab keine ausreichende Proteinproduktion sowie starke Degradation. Außerdem wurde getestet, ob sekretiertes Stp1 Protein (secStp1) in *Pichia pastoris* überproduziert und aus dem Kulturüberstand gereinigt werden konnte. *P. pastoris* wird oftmals für die Produktion sekretierter eukaryotischer Proteine verwendet, da in dieser Hefe ein effizientes Sekretionssystem vorhanden ist (Gellissen und Hollenberg, 1997). Doch auch hier wurden nur geringe Proteinmengen gewonnen, die zudem starke Degradierung aufwiesen (nicht gezeigt).

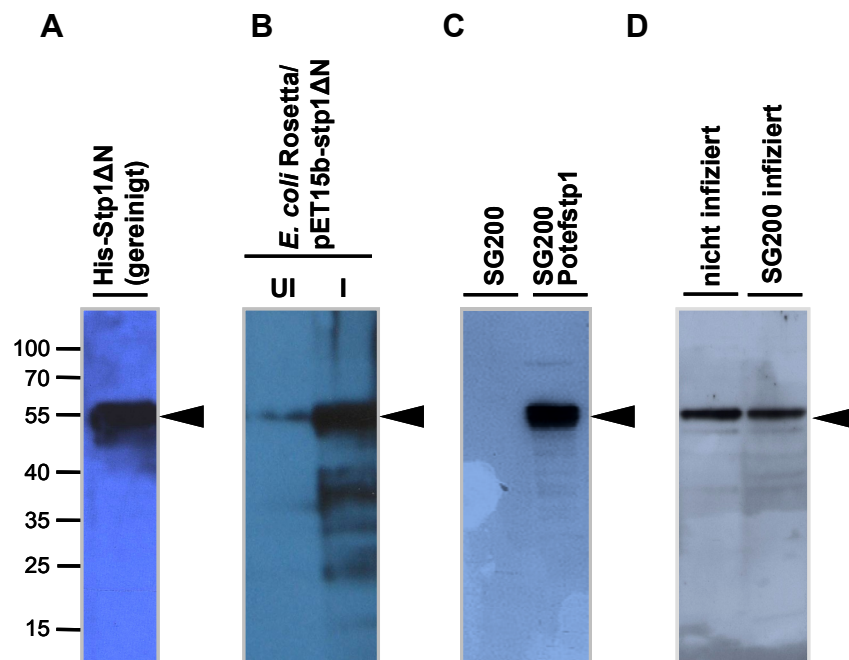


**Abb. 25: Heterologe Expression und Reinigung von His-Stp1 $\Delta$ N aus *E. coli* Rosetta.** Die Laufhöhe des 53 kDa Fusionsproteins His-Stp1 $\Delta$ N wird durch schwarze Pfeile markiert. **A:** Das in großen Mengen produzierte Protein His-Stp1 $\Delta$ N befindet sich nach Fraktionierung von *E. coli* Zellen in der unlöslichen Zelltrümmerfraktion. LF: lösliche Fraktion; UF: unlösliche Fraktion. **B:** Angereichertes His-Stp1 $\Delta$ N Protein, das für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurde, wurde mittels denaturierender Reinigung aus unlöslichen „inclusion bodies“ der unlöslichen Zelltrümmerfraktion gewonnen. LP: Pellet nach Lyse der unlöslichen Fraktion mit 8 M Harnstoff; LÜ: Überstand nach Lyse der unlöslichen Fraktion mit 8 M Harnstoff. Es wurden jeweils identische Volumina jeder Fraktion aufgetragen.

Da das Stp1 Protein nicht in löslicher Form produziert werden konnte, wurde das in *E. coli* Rosetta hergestellte Fusionsprotein His-Stp1 $\Delta$ N für die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern mit 8 M Harnstoff aus Inklusionskörpern solubilisiert. Danach wurde das solubilierte Protein unter denaturierenden Bedingungen mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. So konnte eine ausreichende Aufreinigung mit hoher Ausbeute erreicht werden (Abb. 25B). Das gereinigte Protein His-Stp1 $\Delta$ N wurde für die Immunisierung von zwei Kaninchen eingesetzt (Eurogentec, Liège/Belgien).

Das aus der Immunisierung erhaltene Kaninchen anti-Stp1 Serum zeigte eine deutliche Immunreaktion mit dem in *E. coli* produzierten und gereinigten Stp1 Protein (Abb. 26A). Eine Titration mittels Immunblot ergab, dass der Antikörper eine Minimalmenge von etwa 200 bis 300 ng gereinigtem His-Stp1 $\Delta$ N Protein detektieren konnte, wenn er in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt wurde (nicht gezeigt). Zudem wurde das Immuserum bezüglich der Reaktion und Spezifität im Immunblot mit Zellextrakten aus *E. coli*, *U. maydis* und *Z. mays* getestet. Es war keine Kreuzreaktion mit *E. coli* oder *U. maydis* Proteinen festzustellen, und

das Signal-/Hintergrundverhältnis war sehr gut (Abb. 26B/C). Aufgrund der fehlenden Expression des *stp1* Gens war in axenischen Kulturen von SG200 keine Detektion von Stp1 zu erwarten (Abb. 26B). Bei konstitutiver Expression durch den *otef*-Promotor im Stamm SG200 $\Delta$ stp1-Potefstp1 wurde das Wildtyp Stp1 Protein von den generierten Antikörpern erkannt (Abb. 26C). Das bedeutet, dass die Mehrheit der Antikörper-Epitope gegen das Stp1 Protein und nicht gegen den His-tag gerichtet waren. Der gewonnene Stp1-Antikörper eignete sich somit gut für die Detektion von Stp1 in *E. coli* und *U. maydis*.



**Abb. 26: Spezifität der polyklonalen Kaninchen Anti-His-Stp1 $\Delta$ N Antikörper im Immunblot.** Der primäre anti-Stp1 Antikörper wie auch der sekundäre Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:10000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe der ECL-Reaktion. Die schwarzen Pfeile markieren die erwartete Laufhöhe von Volllängen Stp1 Protein. **A:** Das rekombinant produzierte, gereinigte Protein His-Stp1 $\Delta$ N wird vom Antikörper spezifisch erkannt. Es wurde etwa 1  $\mu$ g Gesamtprotein einer Reinigungsfraction aufgetragen. **B:** Spezifität des Antikörpers in *E. coli* Rosetta/pET15b-stp1 $\Delta$ N-Gesamtzelllysaten. UI: Die Expression von *his-stp1 $\Delta$ N* wurde nicht induziert; I: Die Expression wurde mit 0,1 mM IPTG für eine halbe Stunde induziert. Es wurden identische Volumina aufgetragen. Die Bande in der UI-Fraktion ist auf Promotorleakage zurückzuführen. **C:** Spezifität in *U. maydis* Lysaten. In SG200 wird *stp1* nicht exprimiert und es konnte kein Protein detektiert werden. Bei konstitutiver Expression im Stamm SG200Potefstp1 dagegen wurde Stp1 mit den Stp1-spezifischen Antikörpern erkannt. Es wurden identische Volumina aufgetragen. **D:** Spezifität in Proteinextrakten aus nicht infizierten und SG200 infizierten Maispflanzen. Auf der für Stp1 erwarteten Höhe wurden auch in Extrakten aus nicht infizierten Pflanzen Banden detektiert.

In Maisproteinextrakten erwies sich der Stp1-Antikörper jedoch als unspezifisch (Abb. 26D). Besonders auf der erwarteten Laufhöhe von Stp1 (etwa 50-55 kDa) war in uninifizierten Pflanzen starke Kreuzhybridisierung erkennbar. Ein Verarmen des Antikörpers mit Hilfe von Proteinextrakten uninifizierter Pflanzen führte zwar zur Abschwächung der Kreuzreaktionen, jedoch nicht zur vollständigen Eliminierung des unspezifischen Signals (nicht gezeigt). Für

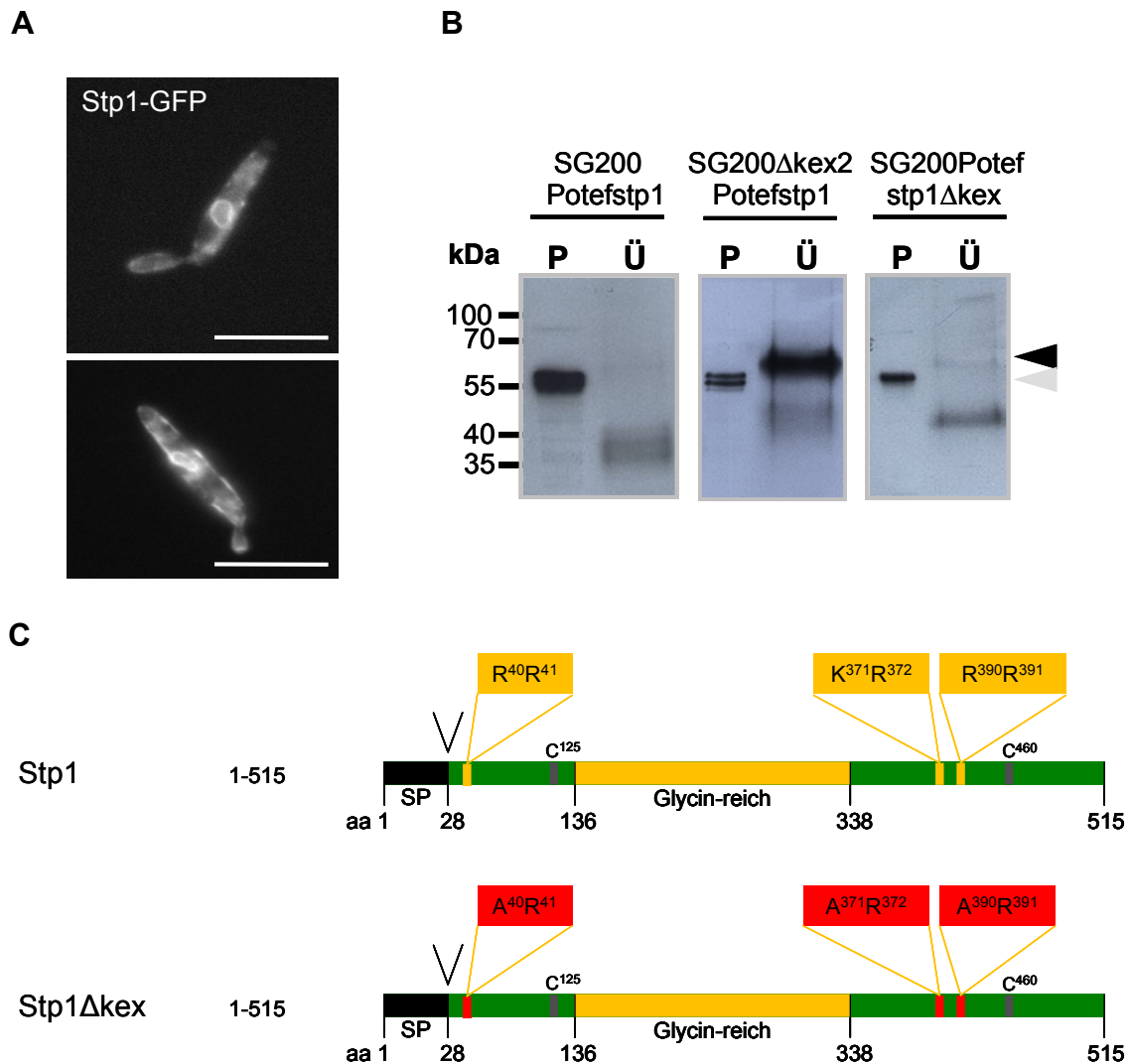
die Detektion von Stp1 in der Maispflanze konnte der Antikörper folglich nicht verwendet werden.

## **2.7 Verifizierung der Sekretion von Stp1 nach konstitutiver Expression in *U. maydis***

Stp1 wies in bioinformatischen Analysen eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit der Sekretion über den kanonischen Weg durch das ER und den Golgi-Apparat auf. Die vorausgesagte Sekretion von Stp1 sollte daher experimentell überprüft werden.

### **2.7.1 Analyse der Stp1 Sekretion in Sporidien**

Um die Sekretion von Stp1 in axenischer Kultur nachzuweisen, wurden zunächst SG200 Derivate verwendet, bei denen die *stp1* Expression von dem starken konstitutiven *otef*-Promotor kontrolliert wurde (SG200Potefstp1). Dieses war nötig, da unter natürlichen Bedingungen keine *stp1* Expression in axenischer Kultur erfolgt (s. 2.5). Um Stp1 nachzuweisen wurde zudem der Stamm SG200Potefstp1-GFP generiert, der konstitutiv das Fusionsprotein Stp1-GFP synthetisiert. Wie für ein sekretiertes Protein zu erwarten war, konnte das Stp1-GFP Signal mit einer typischen ER-Lokalisierung im sekretorischen Apparat von Sporidien des Stammes SG200Potefstp1-GFP detektiert werden (Abb. 27A). Die Untersuchung der Sekretion des nicht-getaggtten Proteins erfolgte durch Westernblot-Analysen mit Stp1-spezifischen Antikörpern. Dazu wurden Sporidien der Stämme SG200 und SG200Potefstp1 während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und durch Zentrifugation in eine Zellpellet- und eine Kulturüberstandsfraktion separiert. Die im Kulturüberstand enthaltenen Proteine wurden für die Immundetektion mittels TCA Fällung angereichert. In nachfolgenden Westernblot-Analysen konnte in dem Stamm SG200 wie erwartet kein Stp1 Protein nachgewiesen werden. Nach konstitutiver Expression im Stamm SGS200Potefstp1 dagegen konnte Stp1 sowohl in der Pelletfraktion als auch im Kulturüberstand detektiert werden (Abb. 27B). Die in der Pelletfraktion detektierte Doppelbande von etwa 55 kDa übertraf die für das Stp1 Wildtyp Protein erwartete Masse, das laut Vorhersage bei 50 kDa lag, leicht. Im Kulturüberstand waren lediglich schwache Signale kleinerer Proteinfragmente (etwa 35 bis 40 kDa), nicht aber das Volllängenprotein nachweisbar (Abb. 27B).



**Abb. 27: Nachweis der Sekretion von Stp1.** **A:** Fluoreszenzbild von Sporidien des Stammes SG200Potefstp1-GFP. Das Bild wurde im GFP-Kanal aufgenommen. Der Größenstandard entspricht 10  $\mu$ m. **B:** Immunblot von in Zellpellet und Mediumüberstand fraktionierten SG200-Potefstp1, SG200 $\Delta$ kex2-Potefstp1 bzw. SG200-Potefstp1 $\Delta$ kex Kulturen. Proteine der Überstandsfractionen wurden aus 50 ml angereichert. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Größe von sekretiertem Volllängen Stp1, der graue Pfeil die berechnete Masse des Proteins. Die Detektion erfolgte mit anti-Stp1 Antikörpern, sowie sekundären HRP-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörpern, jeweils in einer 1:10000 Verdünnung. **C:** Schematische Darstellung des Stp1 Wildtyp sowie des Stp1 $\Delta$ kex Proteins. In Gelb dargestellt sind die drei putativen Kex2-Schnittstellen. Die mutagenisierten Kex2-Schnittstellen im Protein Stp1 $\Delta$ kex sind in Rot dargestellt.

In bioinformatischen Analysen war zuvor aufgefallen, dass die Stp1 Aminosäuresequenz drei klassische dibasische Kexin2-Proteaseschnittstellen enthält. Kexin2 (Kex2) ist eine Subtilisin-ähnliche Protease, die im *trans*-Golgi Netzwerk lokalisiert und dort im Transit befindliche Proteine durch Spaltung an spezifischen dibasischen Motiven aktiviert (Brenner und Fuller, 1992). Die Kex2-Schnittstellen sind in der Stp1 Aminosäuresequenz so verteilt, dass bei Spaltung - soweit abschätzbar - in etwa die im Immunblot detektierten Fragmente von 35 bis 40 kDa entstünden. Daher wurde vermutet, dass im Verlauf der Sekretion eine aktive post-translationale Prozessierung von Stp1 durch die Kex2 Protease stattfinden könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde ein Stamm generiert, bei dem *stp1* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors in einem *kex2* Deletionsstamm exprimiert wurde (SG200 $\Delta$ *kex2*-Potefstp1). Der *kex2* Deletionsstamm SG200 $\Delta$ *kex2* weist einen pleiotrophen Phänotyp auf, bildet auf Aktivkohleplatten keine Filamente aus und ist in Pflanzeninfektionen apathogen (N. Rössel und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Die Analyse von Kulturüberständen des Stammes SG200 $\Delta$ *kex2*-Potefstp1 ist in Abb. 27B dargestellt. Im Gegensatz zu SG200Potefstp1 Kulturüberständen konnte hier eine Volllängen-Bande des Stp1 Proteins detektiert werden, was die Beteiligung der Kex2 Protease an der Prozessierung des Proteins belegt. Im Gegensatz zu dem Zellpellet-assoziierten Stp1-Signal lag die Bande im Überstand mit ca. 65 kDa etwa 15 kDa über der berechneten Masse des Stp1 Volllängenproteins.

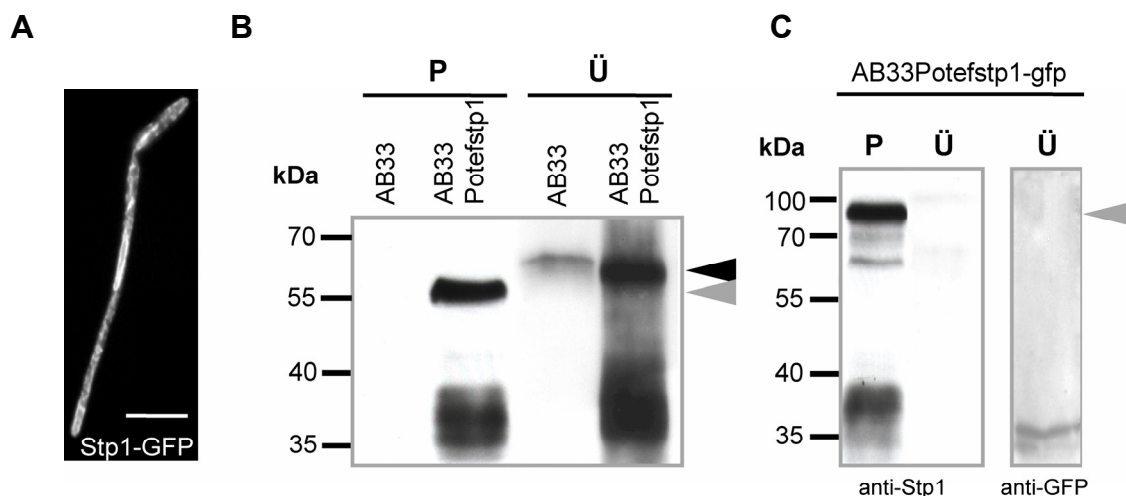
Um zu testen, ob die Stp1 Fragmente in SG200Potefstp1 Kulturüberständen durch Spaltung des Proteins an einer der drei putativen Kex2-Prozessierungsstellen entstehen, wurden diese mutagenisiert (Abb. 27C). Kulturüberstände des resultierenden Stammes SG200stp1 $\Delta$ *kex* wurden wiederum mittels Westernblot-Analyse untersucht. Trotz mutagenisierter Kex2-Schnittstellen konnten noch Stp1 Fragmente im Kulturüberstand detektiert werden. Diese wiesen jedoch im Vergleich zu zuvor beobachteten Fragmenten eine etwas größere Masse von etwa 45 kDa auf. Zudem war im Zellpellet nur noch eine Bande auf der Höhe von 55 kDa detektierbar. Diese Veränderungen weisen darauf hin, dass durch die eingebrachten Mutationen tatsächlich Erkennungsstellen der Kex2-Protease eliminiert wurden. Dennoch führte die Mutagenese nicht zu einer vollständigen Verhinderung der Stp1 Prozessierung in Sporidien.

### 2.7.2 Analyse der Stp1 Sekretion in b-abhängigen Filamenten

Die Analyse von Kulturüberständen haploider Sporidien, in denen *stp1* konstitutiv exprimiert wurde, zeigte jeweils nur eine sehr schwache Sekretion von Stp1. Das Protein musste für eine erfolgreiche Detektion aus dem Kulturüberstand angereichert werden und konnte in Gegenwart der Kex2-Protease lediglich in Form von Fragmenten immunologisch nachgewiesen werden. Fraglich war, ob die sekretierten Stp1 Fragmente von physiologischer Relevanz waren. Da die Möglichkeit bestand, dass die konstitutiv starke Sekretion von Proteinen, die spezifisch für das biotrophe Wachstum von *U. maydis* benötigt werden, in Sporidien zu Problemen führen könnte, wurde die Sekretion von Stp1 auch in Filamenten untersucht. In dem haploiden FB2-Derivat AB33 kann die Bildung b-abhängiger Filamente durch einen Wechsel von Ammonium- zu Nitratminimalmedium stimuliert werden. Dieses ist möglich, weil die *b*-Gene in diesem Stamm durch den Nitrat-induzierbaren *nar*-Promotor

reguliert werden (Brachmann, 2001; Brachmann *et al.*, 2001). Die Ergebnisse von *U. maydis* cDNA-Microarrays, in denen b-induzierte Gene mit Hilfe des Stammes AB33 identifiziert wurden (Vraneš, 2007), zeigten zudem, dass *stp1* zu dieser Gruppe induzierter Gene gehört. Daher war zu hoffen, dass die Sekretion von Stp1 auch ohne künstliche Überproduktion in b-induzierten Filamenten nachweisbar sein könnte.

Der Stamm AB33 wurde daher nach Induktion des filamentösen Wachstums bezüglich der Sekretion von Stp1 untersucht. Außerdem wurden AB33-Derivate, in denen Stp1 und Stp1-GFP unter der Kontrolle des *otef*-Promotors konstitutiv produziert wurden, in die Analysen einbezogen. Zur Herstellung dieser Stämme wurden die Plasmide p123-Potefstp1 bzw. p123-Potefstp1:gfp in den *ip*-Lokus von Stamm AB33 integriert, wodurch die Stämme AB33Potefstp1 und AB33Potefstp1-GFP entstanden. Letzterer wurde zunächst für die Lokalisierung des Stp-GFP Fusionsproteins in Pilzhyphen verwendet. In Abb. 28A ist die Lokalisierung von Stp1-GFP nach sechsständiger Induktion der *b*-Gene in Nitrat-haltigem Medium dargestellt. Wie schon in Sporidien nachgewiesen wurde, konnte das Fusionsprotein in der sekretorischen Maschinerie der AB33 Hyphen detektiert werden.



**Abb. 28: Lokalisierung von Stp1 und Stp1-GFP in AB33 Hyphen.** **A:** Lokalisierung von konstitutiv exprimiertem *stp1:gfp* in b-induzierten Filamenten des Stammes AB33Potefstp1-GFP. Der Größenstandard entspricht 10  $\mu\text{m}$ . **B:** Westernblot-Analyse mit Stp1-spezifischen Antikörpern von in Zellpellet und Mediumüberstand fraktionierten *stp1* im Stamm AB33 sowie im AB33Potefstp1 Überexpressionsstamm. **C:** Westernblot-Analyse von AB33Potefstp1-GFP. P: Pelletfraktion; Ü: Kulturüberstand. Proteine aus Überstandsfractionen wurden aus 300 ml Minimalmedium angereichert. Die verwendeten Antikörper sind in der Abb. dargestellt. Graue Pfeile kennzeichnen die berechneten Größen der jeweiligen Proteine; der schwarze Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe von sekretiertem Stp1.

Mittels Immunblot konnte nach zehnstündiger Induktion des Stammes AB33 in der Zellpelletfraktion kein Stp1 Protein nachgewiesen werden (Abb. 28B). In Kulturüberständen dagegen war Stp1 auf einer Höhe von etwa 65 kDa detektierbar (Abb. 28B). Diese Größe entsprach der in SG200 $\Delta$ kex2 Stämmen beobachteten Größe von konstitutiv exprimiertem

Stp1. Dies weist darauf hin, dass in b-abhängigen Filamenten von *U. maydis* keine Kex2-abhängige Prozessierung von Stp1 stattfindet.

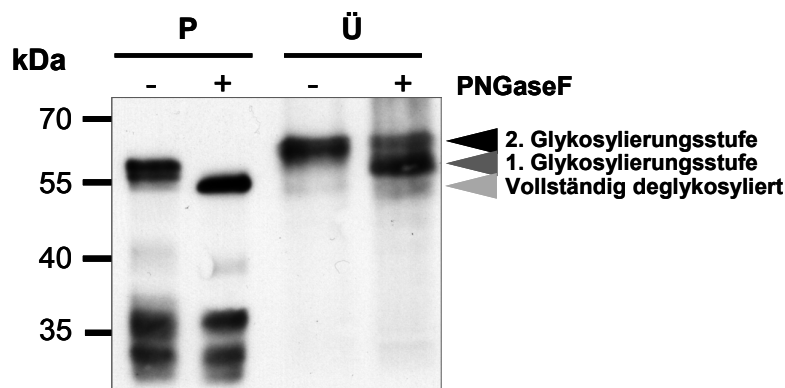
Wurde *stp1* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors in AB33 überexprimiert, konnte dagegen auch Protein im Zellpellet nachgewiesen werden (Abb. 28B). Zusätzlich zur etwa 55 kDa-Bande des Volllängen Proteins wurden dabei Fragmente zwischen 35 und 40 kDa detektiert. Auch hier konnte in Kulturüberständen das im Vergleich zum Zellpellet um etwa 10 kDa vergrößerte Stp1 Protein identifiziert werden. Zudem waren wiederum Fragmente zwischen 35 und 40 kDa vorhanden.

Um zu untersuchen, ob das Fusionsprotein Stp1-GFP ebenfalls in voller Länge sekretiert wird, wurden Zellpellet und Überstand des Stammes AB33Potefstp1-GFP ebenfalls im Immunblot analysiert (Abb. 28C). Hier konnte das Volllängen-Protein zusammen mit kleineren Fragmenten im Zellpellet detektiert werden. Im Kulturüberstand konnte keine Stp1-GFP Bande detektiert werden. Dieses konnte durch die Wiederholung des Blots mit GFP-spezifischen Antikörpern bestätigt werden. Das Fusionsprotein war auch hier nicht nachweisbar und stattdessen konnte eine Bande von etwa 35 kDa detektiert werden (Abb. 28C). Dieses entsprach vermutlich einem kurzen C-terminalen Stp1 Fragment, fusioniert an GFP. Ein intaktes sekretiertes Stp1-GFP Fusionsprotein konnte also in AB33-Potefstp1-GFP Kulturen nicht nachgewiesen werden.

### 2.7.3 Untersuchungen zur post-translationalen Modifikation von Stp1

Sekretierte Proteine liegen oftmals als Glykoproteine vor. Dabei werden im ER oder Golgi-Apparat Kohlenhydratketten an die auf dem Weg zum Extrazellularraum befindlichen Proteine geknüpft. Sekretierte Proteine liegen dabei meist als N-vernetzte Glykoproteine vor. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Massenzuwachs von Stp1 im Überstand verglichen mit dem Zellpellet auf eine N-Glykosylierung des Proteins im Verlauf der Sekretion zurückzuführen ist, wurden Deglykosylierungsversuche durchgeführt (Abb. 29). Dazu wurde die Zellpellet- sowie die Kulturüberstandsfraction des Stammes AB33Potefstp1 mit der Deglykosidase PNGaseF, die jegliche Typen von N-Glykosylierungen von Glykoproteinen entfernt, behandelt. Sowohl das im Pellet befindliche Stp1 als auch das sekretierte Stp1 zeigten nach der enzymatischen Deglykosylierung ein verringertes Molekulargewicht. Es konnten dabei zwei Glykosylierungsgrade unterschieden werden. Im Zellpellet verringerte sich das Molekulargewicht um etwa 5 kDa, im Überstand dagegen um 10 bis 15 kDa. In unvollständigen Deglykosylierungsreaktionen wies sekretiertes Stp1 zwei Abbaustufen auf

(Abb. 29). Die Inkubation mit dem unspezifischeren Enzym EndoH, das vorwiegend Mannosereste entfernt, führte zu vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt).



**Abb. 29: Nachweis von Stp1 Glykosylierung.** Westernblot-Analyse von in Zellpellet und Mediumüberstand fraktioniertem Stp1 in Überexpressionskulturen des Stammes AB33Potefstp1. Sowohl das Zellpellet als auch der Kulturüberstand wurden zur Deglykosylierung mit PNGaseF behandelt. Die Deglykosylierung des Überstandes war unvollständig, so dass ein intermediäres Zwischenprodukt (1. Glykosylierungsstufe) sichtbar ist.

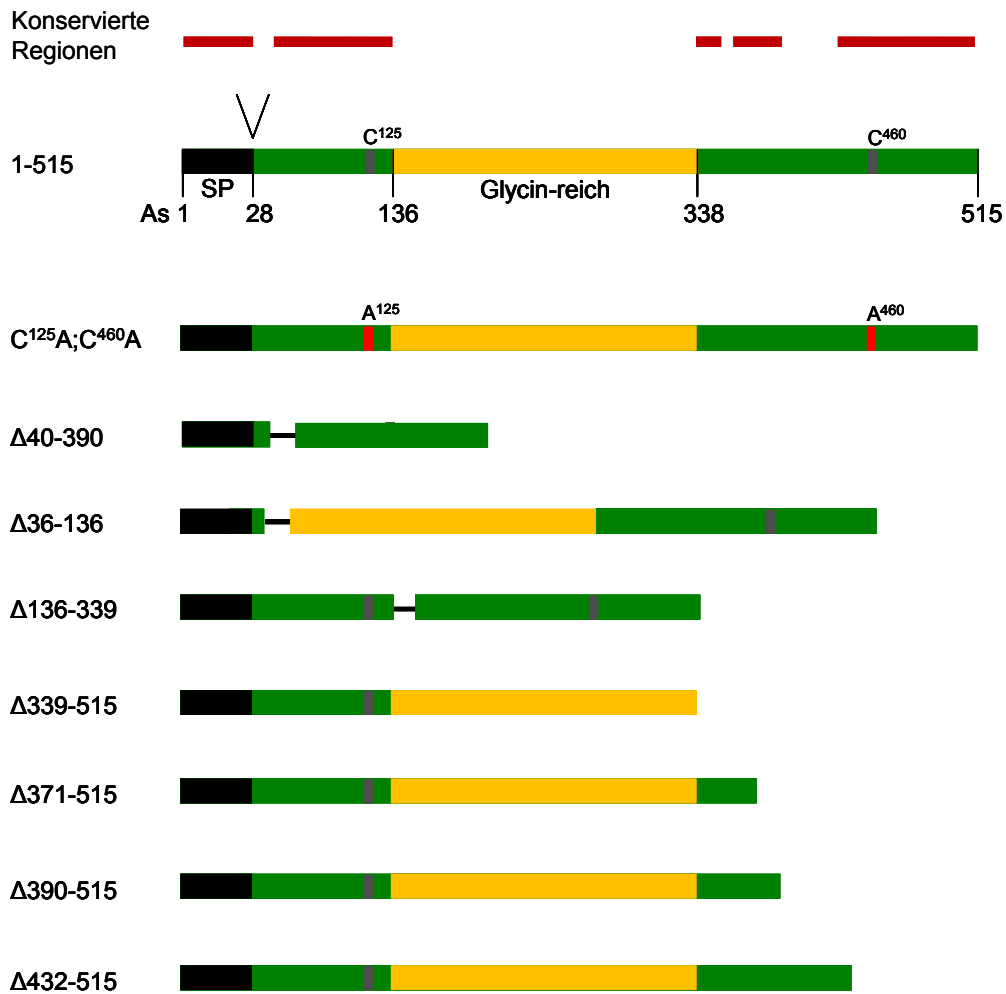
## 2.8 Untersuchungen zur Domänenstruktur von Stp1

Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Stp1 Orthologe aus nahe verwandten Brandpilzen hatten ergeben, dass Stp1 in drei Domänen unterteilt werden kann, von denen die N- und C-terminale stark konserviert und die mittlere schwach konserviert ist (vgl. 2.2.4). Um zu testen, ob konservierte Bereiche wichtig für die Funktion des Proteins sind, wurde die SG200 $\Delta$ stp1 Mutante mit *stp1* Allelen komplementiert, bei denen Bereiche des N- bzw. des C-Terminus deletiert waren. Außerdem wurden Allele hergestellt, in der die interne Glycinreiche Region sowie darüber hinausgehende zentrale Bereiche des Proteins deletiert waren. In Abb. 30 sind die Mutantenproteine schematisch gezeigt.

Sekretierte Effektoren, die im Apoplasten lokalisieren und wirken, zeigen häufig ein überdurchschnittliches Vorkommen von Cystein-Resten, die meist in gerader Anzahl vorhanden sind. Da im reduzierenden Milieu diese Reste Cysteinbrücken ausbilden, haben sie wahrscheinlich eine stabilisierende Wirkung im Apoplasten (Van Esse *et al.*, 2006). Um herauszufinden, ob die beiden Cystein-Reste in Stp1 wichtig für die Funktion des Proteins sind, wurden an Position 125 und 460 Alaninsubstitutionen eingeführt.

Um festzustellen, ob die *stp1* Deletionsmutante durch die unterschiedlichen Mutantenallele komplementiert werden kann, wurden Infektionstests durchgeführt (Tabelle 5).





**Abb. 30: Schematische Darstellung der Stp1 Mutantenproteine.** Das Stp1 Protein umfaßt 515 Aminosäuren, von denen die ersten 28 laut bioinformatischer Vorhersage von der Signalpeptidase entfernt werden. Die jeweiligen Konstrukte, die für verkürzte und punktmutierte Stp1 Derivate kodieren, wurden in einfacher Kopie in den *ip*-Lokus von SG200 $\Delta$ stp1 integriert. Eine Ausnahme bildeten dabei lediglich die Konstrukte  $\Delta$ 371-515 sowie  $\Delta$ 390-515 welche als GFP-Fusionen in den endogenen *stp1*-Lokus inseriert wurden und so das ursprüngliche Allel ersetzen. SP = Signalpeptid. In SrStp1 und UhStp1 stark konservierte Bereiche sind oben angegeben (rote Balken).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Cysteinreste keine Bedeutung für die Proteinfunktion haben (KS23). Sowohl die Deletion des N-Terminus wie auch die Deletion des C-Terminus führte zu einem völligen Verlust der Stp1 Funktion, d. h. in keiner der entsprechenden Stämme konnte Tumorbildung nach Pflanzeninfektion beobachtet werden (KS18-KS22). Die Deletion des zentralen Bereiches in Stp1 (KS17) führte ebenfalls dazu, dass der *stp1* Deletionsphänotyp nicht komplementiert werden konnte. Dagegen wies der Stamm KS16, in dem die nur Glycin-reiche Region (As 136-339) deletiert worden war, keine Beeinträchtigungen der Pathogenität auf. Der *stp1* Deletionsphänotyp wurde hier vollständig komplementiert (Tabelle 5). Die Mutationsanalyse ergab also, dass die konservierten N- und C-terminalen Teile von Stp1 essentiell für die Proteinfunktion sind, der variable zentrale

Glycin-reiche Bereich hingegen deletierbar ist. Intermediäre Phänotypen, z. B. Anthozyanbildung, wurden nicht beobachtet (nicht gezeigt).

**Tabelle 5: Komplementation von *stp1* Deletionsmutanten durch mutierte *stp1* Allele<sup>1</sup>.**

<b>Stamm</b>	<b>Protein</b>	<b>Tumorrare</b>	<b>(Anzahl Pflanzen mit Tumoren/ Gesamtzahl infizierter Pflanzen)</b>
SG200	Stp1 1-515 (Wildtyp)	73%	(82/112)
SG200 $\Delta$ stp1		0%	(0/85)
KS23	Stp1C <sup>125</sup> A,C <sup>460</sup> A	71,5%	(86/120)
KS18	Stp1 $\Delta$ 36-136	0%	(0/56)
KS16	Stp1 $\Delta$ 136-339	75,6%	(79/105)
KS17	Stp1 $\Delta$ 40-390	0%	(0/118)
KS19	Stp1 $\Delta$ 339-515	0%	(0/134)
KS21	Stp1 $\Delta$ 371-515	0%	(0/109)
KS22	Stp1 $\Delta$ 390-515	0%	(0/122)
KS20	Stp1 $\Delta$ 432-515	0%	(0/95)

<sup>1</sup> Die jeweils kodierte Proteinversionen können außerdem der Abb. 30 entnommen werden.

## 2.9 Studien zur Lokalisierung von Stp1 in infizierten Maispflanzen

Um die Funktion eines sekretierten Effektors herauszufinden, ist es wichtig, den genauen Funktionsort zu kennen. In diesem Kapitel werden verschiedene mikroskopische wie biochemische Lokalisierungsstudien, die zur Ermittlung des Funktionsortes von Stp1 während des biotrophen Wachstums von *U. maydis* durchgeführt wurden, dargestellt. Zunächst galt es dabei, die Sekretion von Stp1 in intrazellulär wachsenden Hyphen zu verifizieren. Zum anderen aber sollte auch die Möglichkeit einer Translokation in die Pflanzenzelle, wie etwa für das Rostprotein Rtp1 gezeigt (Kemen *et al.*, 2005), untersucht werden.

### 2.9.1 Lokalisierung von fluoreszenzmarkiertem Stp1 durch konfokale Mikroskopie

Der naheliegendste Ansatz für die mikroskopische Visualisierung eines Pilzproteins ist die Fusion an fluoreszierende Proteine wie beispielsweise das grün fluoreszierende Protein GFP. Dazu wurde der Stamm SG200stp1-GFP generiert, welcher im endogenen Locus eine 3'-terminale Fusion von *gfp* mit dem offenen Leseraster von *stp1* trägt und das Fusionsgen unter der Kontrolle des *stp1*-Promotors exprimiert. Nachdem die volle Funktionalität des Fusionsproteins in Pflanzeninfektionen verifiziert worden war (Tabelle 6), erfolgte die

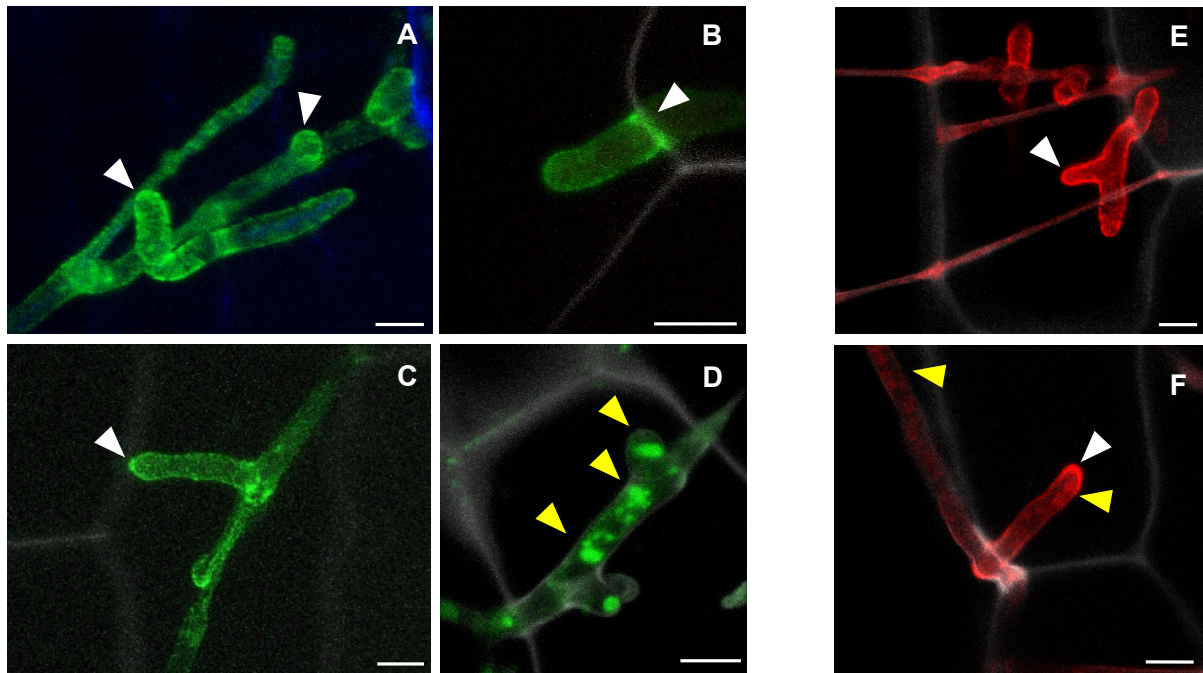
Lokalisierung mit Hilfe von konfokaler Laserscanning-Mikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. G. Doehle (MPI Marburg). Die in Abb. 31 abgebildeten konfokalen „Z-stacks“ zeigen intrazellulär in der Pflanzenepidermis wachsende Hyphen zwei bis sieben Tage nach Infektion. Das grün dargestellte Stp1-GFP Fusionsprotein ummantelte zwischen zwei und vier Tagen nach Infektion die Pilzhypen (Abb. 31A-C). Dabei akkumulierte das Protein vor allem an Hyphenspitzen und an intrazellulären Zell-Zell-Penetrationsstellen, wo die Pilzhypen von einer Pflanzenzelle in die Benachbarte einwuchsen. Diese Penetration geschieht mit Hilfe einer Appressorien-ähnlichen Struktur (Doehle *et al.*, 2008a), an deren apikaler Seite sich das Fusionsprotein vermehrt sammelte. Die Verteilung des Fluoreszenzsignals war dabei nicht gleichmäßig sondern fleckig. Vier bis fünf Tage nach Infektion änderte sich die Lokalisierung von Stp1-GFP und die Fluoreszenz akkumulierte verstärkt in rundlichen Strukturen innerhalb der Pilzhypen, die vermutlich Vakuolen darstellten (Abb. 31D). Das Auftreten dieser Strukturen wurde zunächst parallel in Hypen beobachtet, die auch noch die Hyphe-ummandelnde Fluoreszenz zeigten (nicht gezeigt). Zu späteren Zeitpunkten war dann nur noch die Lokalisierung in den vermuteten Vakuolen sichtbar.

**Tabelle 6: Virulenz von SG200 Stämmen, die Stp1-Derivate anstelle des Wildtyp Proteins produzieren.<sup>1</sup>**

Stamm	Tumorbildung/ Zahl infizierter Pflanzen
SG200	67% (114)
SG200stp1-GFP#5	63% (116)
SG200stp1-RFP#4	60% (113)
SG200stp1-HA#8	68% (105)
SG200stp1- mCherryHA#1	84% (112)
SG200stp1(SP) mCherryHA#7	77% (115)
SG200stp1-FLP#1	23% (65)

<sup>1</sup> Angegeben sind die Boniturdaten zwölf Tage nach Infektion.

Das Maisgewebe wies besonders nach *U. maydis* Infektionen einen starken Fluoreszenzhintergrund auf (vgl. 2.4.1). Dies führte zu Problemen bei der Trennung des „echten“ GFP-Fluoreszenzsignals vom pflanzlichen Hintergrundsignal. Folglich konnte bei der Detektion von Stp1-GFP innerhalb der Pflanze keine Aussage über schwache Signale gemacht werden.



**Abb. 31: Lokalisierung von Stp1-GFP und Stp1-RFP in intrazellulären wachsenden *U. maydis* Hyphen.** **A-D:** Infektion mit SG200stp1-GFP. Stp1-GFP ist in grün dargestellt. Autofluoreszenz ist in weiß bzw. blau abgebildet. **A:** 2 dpi; **B:** 3 dpi; **C:** 4 dpi. **D:** 7 dpi. **E/F:** Infektion mit SG200stp1-RFP. Stp1-RFP ist rot, Autofluoreszenz weiß dargestellt. **E:** 4 dpi; **F:** 5 dpi. Weiße Pfeile bezeichnen Orte der verstärkten Stp1 Sekretion, gelbe Pfeile intrazelluläre Akkumulationen. Bei allen Bildern handelt es sich um konfokale Z-stacks. Der Größenstandard entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Um die Lokalisierung des Stp1-GFP Fusionsproteins abzusichern wurde daher ein Stamm hergestellt, der das Stp1-Protein fusioniert an das rot fluoreszierende Protein RFP produziert (SG200stp1-RFP). Das entsprechende Konstrukt wurde wiederum in den endogenen *stp1*-Lokus einbracht. In Pflanzeninfektionen mit SG200stp1-RFP konnte verifiziert werden, dass das Fusionsprotein Stp1-RFP funktionell war (Tabelle 6). Die Lokalisation von Stp1-RFP sollte die für Stp1-GFP beobachtete Lokalisierung absichern und barg zusätzlich den Vorteil, dass im Emissionsbereich von RFP weniger Autofluoreszenz detektiert wird und daher eine bessere Signaltrennung möglich ist. Auch in diesem Stamm ummantelte das Signal die intrazellulär wachsenden Hyphen und akkumulierte an Hyphenspitzen und Zell-Zell-Passagen der Hyphen (Abb. 31E/F). Wie für Stp1-GFP konnte nach fünf Tagen eine beginnende Akkumulation innerhalb der Hyphen beobachtet werden (Abb. 31E/F). Da die Signalintensität der RFP-Fluoreszenz sehr viel geringer als die für GFP war, konnten hier ebenfalls nur starke Fluoreszenzsignale detektiert werden. Eine mögliche Diffusion von Stp1 in Zellzwischenräume oder ein potentieller Transfer ins Cytoplasma der Maiszellen hätte folglich weder durch die Fusion von Stp1 an GFP noch an RFP visualisiert werden können. Da das Fluoreszenzsignal in beiden Stämmen während der frühen Kolonisierung der Pflanze die Pilzhypen ummantelte, konnte jedoch geschlossen werden, dass das Fusionsprotein von

der Pilzhyphe sekretiert wurde. Es konnte aber mit dieser Methodik nicht differenziert werden, ob sich das Fusionsprotein im Apoplasten, in der Pilzzellwand oder der Mais-Cytoplasmamembran befand. Außerdem war nicht sichergestellt, dass das Fusionsprotein nach der Sekretion intakt geblieben war.

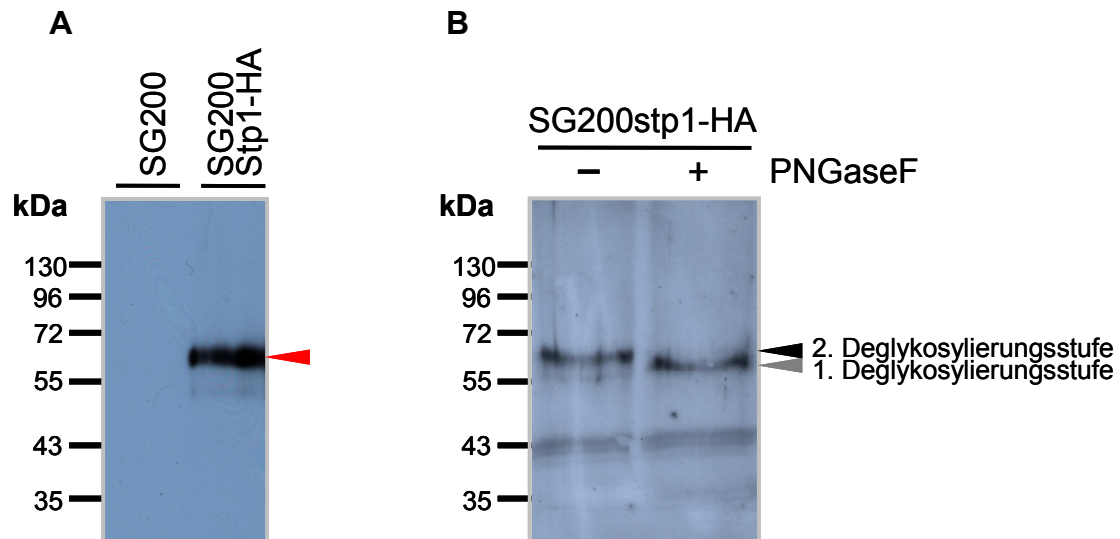
### 2.9.3 Immundetektion von Stp1 in Proteinextrakten infizierter Pflanzen

Die Frage, ob die Stp1-Fusionsproteine im Apoplasten der Maispflanzen gespalten wurden und somit lediglich der fluoreszente „tag“ detektiert wurde, sollte mit Hilfe von Westernblot-Analysen beantwortet werden. Die Detektion von Stp1-GFP oder Stp1-RFP in Proteinextrakten infizierter Pflanzen erwies sich jedoch aufgrund eines starken unspezifischen Hintergrundes als unmöglich (nicht gezeigt). So musste zunächst ein „tag“-spezifischer Antikörper gefunden werden, mit dem in Pflanzenproteinextrakten möglichst wenig Hintergrund erkennbar war. In Zusammenarbeit mit Dr. S. Reissmann (MPI Marburg) wurde ein Hämagglutinin-spezifischer Antikörper (anti-HA) identifiziert, der in Proteinextrakten uninfizierter wie infizierter Maispflanzen keine oder nur sehr schwache unspezifische Signale im Immunblot erzeugte.

Um zu testen, ob ein Stp1-HA Fusionsprotein in Maisextrakten detektierbar ist, wurde ein Stamm generiert, der Stp1-HA synthetisiert (SG200stp1-HA). In Pflanzeninfektionen konnte gezeigt werden, dass das Stp1-HA Fusionsprotein funktionell ist (Tabelle 6; s. 2.9.1). Jedoch konnte auch dieses Protein mittels Immunblot mit anti-HA Antikörpern nicht in Gesamtproteinextrakten infizierter Pflanzen detektiert werden. Aus diesem Grund wurde das Protein durch Immunpräzipitation mit anti-HA Antikörpern aus mit SG200stp1-HA infizierten Maispflanzen stark angereichert, was letztendlich die Detektion des Fusionsproteins Stp1-HA ermöglichte (Abb. 32A). Das im Westernblot abgeschätzte Molekulargewicht des immunpräzipitierten Stp1-HA Proteins deutete darauf hin, dass es sich um das zweifach glykosylierte Protein (Glykosylierung 2. Stufe, vgl. 2.2.3) von etwa 65 kDa handelte. Der HA-tag fiel mit etwa 1 kDa dabei nicht ins Gewicht. Dies zeigt, dass die sekretierte Form des Stp1-Vollängenproteins in den Pflanzenextrakten vorliegt. C-terminale Abbauprodukte wurden nicht beobachtet; N-terminale Abbauprodukte konnten aufgrund des C-terminalen tags nicht immunpräzipitiert werden.

Um zu beweisen, dass es sich bei dem detektierten, etwa 65 kDa Protein um N-glykosyliertes Stp1-HA Protein handelte, wurde es nach der Immunpräzipitation mit PNGaseF behandelt. Durch die Deglykosylierung wurde ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa erreicht, was dem 1. Glykosylierungszustand entspricht (Abb. 32B). Völlig deglykosyliertes Protein konnte

nicht nachgewiesen werden, jedoch war die Reaktion auch in den vorangehenden Experimenten wenig effizient gewesen (vgl. 2.7.3). Somit konnte eindeutig verifiziert werden, dass es sich bei dem detektierten Protein um N-glykosyliertes Stp1-HA handelte.



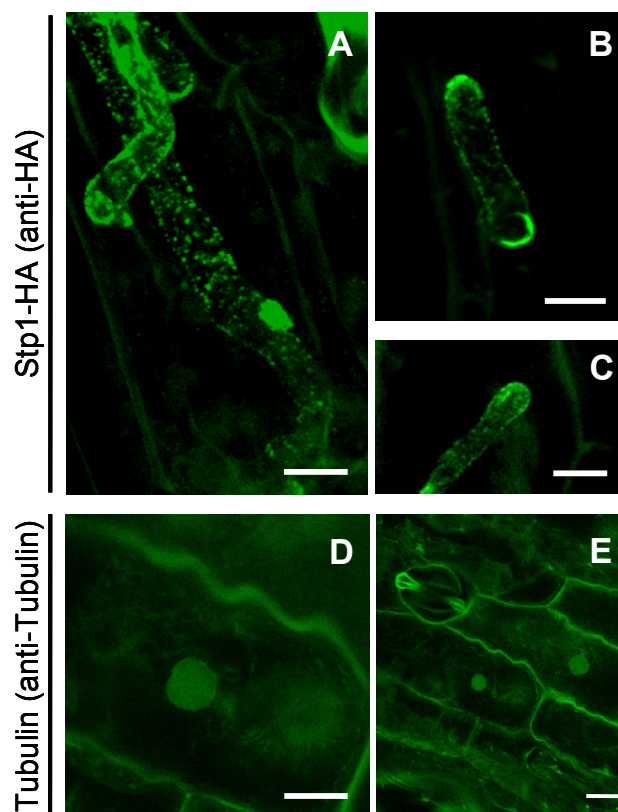
**Abb. 32: Immunpräzipitation von N-glykosyliertem Stp1-HA aus mit SG200stp1-HA infizierten Pflanzen.** **A:** Immunpräzipitation von Stp1-HA. Das Protein (roter Pfeil) wurde aus etwa 45 infizierten Pflanzen mittels Bindung an anti-HA Antikörper extrahiert. Als Negativkontrolle wurden mit SG200 infizierte Pflanzen verwendet. **B:** Deglykosylierung von aus infizierten Pflanzen immunpräzipitiertem Stp1-HA durch das Enzym PNGaseF bewirkte einen Molekulargewichtsverlust von etwa 10 kDa. Das Protein wurde vor der Deglykosylierung aus etwa 45 mit SG200stp1-HA infizierten Pflanzen mittels Bindung an anti-HA Antikörper extrahiert.

### 2.9.3 Immuncytochemische *in situ* Lokalisierung von Stp1-HA

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, konnte sekretiertes Stp1-HA als Volllängenprotein erfolgreich aus Proteinextrakten infizierter Pflanzen isoliert werden. Abbaubanden oder unspezifische Signale waren nicht erkennbar. Aus diesem Grund eignete sich dieses Fusionsprotein sehr gut zur Bestimmung der Lokalisierung nach Pflanzeninfektion. Mit Hilfe der in Sauer *et al.* (2006) beschriebenen immuncytochemischen *in situ* Lokalisierung sollte Stp1-HA daher in mit SG200stp1-HA infiziertem Maisgewebe detektiert werden. Für die *in situ* Lokalisierungstechnik wurde das Gewebe zunächst fixiert. Dann wurde es durch Inkubation mit Driselase und Schockgefrieren porös gemacht, was die Detektion von Proteinen mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern ermöglichte. Im Falle von Stp1-HA wurde primär ein Maus anti-HA Antikörper, sekundär ein anti-Maus Antikörper, gekoppelt an die Fluoreszenzfarbstoffe Alexafluor488 bzw. 633 (AF488/AF633), verwendet. Als Positivkontrolle wurde zudem ein gegen Tubulin gerichteter primärer Antikörper verwendet. Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde wiederum in Zusammenarbeit mit Dr. G. Doehlemann durchgeführt. Die *in situ* Lokalisierungsmethode konnte erfolgreich

für die Detektion von Stp1-HA und Tubulin in infizierten Maisgeweben angewendet werden (Abb. 33).

Mit Tubulin-spezifischen Antikörpern, die als Positivkontrolle verwendet wurden, konnte in mit SG200 infizierten Pflanzen die für Mikrotubuli erwartete Lokalisierung in Form eines filamentösen Netzwerks im Cytoplasma und dem perinuklearen Raum detektiert werden (Abb. 33D/E). Die Lokalisierung von Stp1-HA mittels HA-spezifischen Antikörpern spiegelte die *in vivo* beobachtete Hyphenummantelung wieder. Zudem konnte mit diesem Verfahren die fleckige Verteilung des Signals sehr gut dargestellt werden (Abb. 33A-C). Allerdings war die Sensitivität dieser Methode vergleichbar mit der des Nachweises von Stp1 über Stp1-GFP oder Stp1-RFP Fusionsproteine. So konnte lediglich die bereits bekannte Lokalisierung bestätigt, nicht aber neue Erkenntnisse dazugewonnen werden. Auch war bei der mikroskopischen Auswertung wiederum ein hohes Hintergrundsignal störend, welches bei AF488- (Abb. 33) und bei AF633-gekoppelten sekundären Antikörpern (nicht gezeigt) auftrat und das Abgrenzen schwacher Signale unmöglich machte.



**Abb. 33: Immunocytochemische *in situ* Lokalisierung von Stp1-HA.** Für die Detektion im konfokalen Laserscanning-Mikroskop wurden sekundäre anti-Maus AF488-gekoppelte Antikörper verwendet. Das Signal ist somit in grün dargestellt. **A-C:** Lokalisierung von Stp1-HA in mit SG200stp1-HA infizierten Pflanzen durch primäre anti-HA Antikörper. **D/E:** Lokalisierung von Mais-Tubulin in mit SG200 infizierten Pflanzen durch primäre anti-Tubulin Antikörper. Bilder: G. Doehlemann. Der Größenmaßstab entspricht 5  $\mu$ m.

#### 2.9.4 Plasmolyse-Experimente zur Detektion von Stp1 im Apoplasten

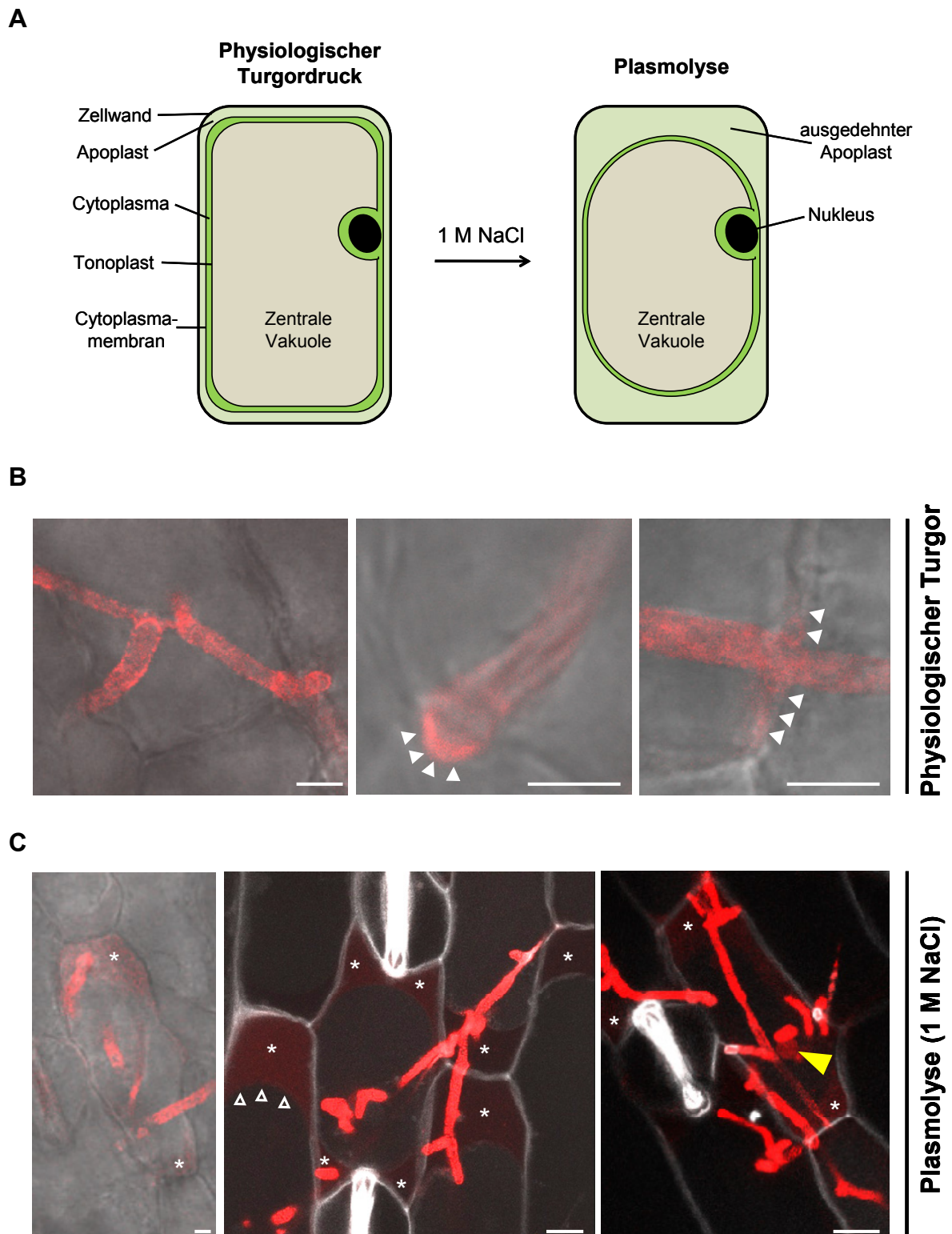
Auf der Suche nach sensitiveren *in vivo* Lokalisierungsmethoden konnte für das sekretierte *U. maydis* Protein Pep1 erfolgreich eine C-terminale Proteinfusion an mCherry und HA verwendet werden (Pep1-mcherryHA; Doehlemann *et al.*, 2009). Der Vorteil dieses Fusionsproteins lag erstens darin, dass es nach Immunpräzipitation im Westernblot mit anti-HA Antikörpern nachgewiesen werden konnte. So konnte kontrolliert werden, ob das Volllängenprotein vorhanden war. Zudem war mCherry aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften sehr gut geeignet für die Detektion in Mais: Der hochwellige Anregungsbereich erzeugt nur wenig Hintergrundsignal in infizierten Maispflanzen und die Fluoreszenzintensität des Proteins ist im Vergleich zu RFP verstärkt.

Für die Lokalisierung eines Stp1-mCherryHA Fusionsproteins wurde der Stamm SG200stp1-mcherryHA konstruiert. Die volle Funktionalität des Fusionsproteins wurde wiederum in Pflanzeninfektionen bestätigt (Tabelle 6, s. 2.9.1).

Nach Infektion von Maispflanzen mit SG200 konnte die für Stp1-GFP, Stp1-RFP und Stp1-HA gezeigte Hyphenummantelung bestätigt werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten konnte weiterhin beobachtet werden, dass das Signal an Zell-Zell-Passagen nicht nur akkumulierte, sondern sich auch an den Rändern entlang der Pflanzenzellwand ausbreitete (Abb. 34B). Dies deutete erstmals darauf hin, dass sich das Fusionsprotein im Apoplast ausbreitete und dabei nicht mehr in direktem Kontakt mit der Pilzhyph stand.

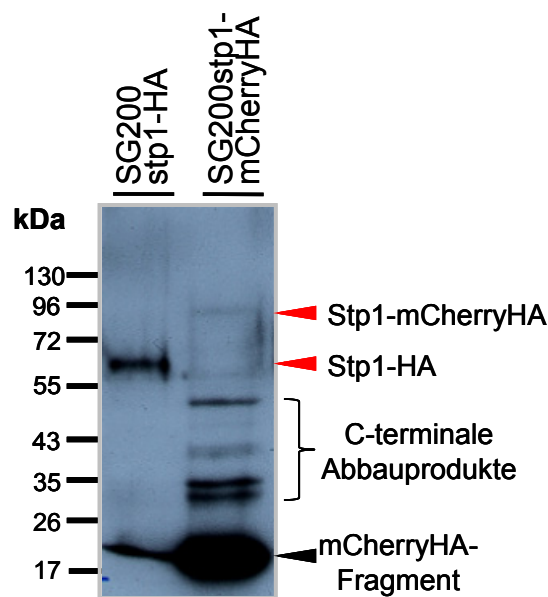
Durch die Induktion von Plasmolyse infizierter Pflanzenzellen konnte für Pep1-mCherryHA die Diffusion des Fusionsproteins aus der Interaktionszone in den Apoplast infizierter Zellen gezeigt werden (Doehlemann *et al.*, 2009). Bei der Plasmolyse, die durch die Zugabe hochosmotischer Lösungen (z. B. 1 M NaCl) induziert werden kann, zieht sich die zentrale Vakuole und damit der gesamte Protoplast der Pflanzenzelle zusammen, so dass an den peripheren Bereichen der Zelle vergrößerte apoplastische Räume entstehen (Abb. 34A). Die Frage, ob Stp1 wie Pep1 nach der Sekretion frei im Apoplast diffundiert oder fest an die Zellwand des Pilzes oder die Cytoplasmamembran der Pflanze gebunden verbleibt, sollte durch ein solches Plasmolyseexperiment beantwortet werden. Die zugehörige konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde wiederum in Kollaboration mit Dr. G. Doehlemann durchgeführt. Auch für Stp1-mCherryHA konnte eine gleichmäßige Ausbreitung in die ausgedehnten apoplastischen Räume beobachtet werden (Abb. 34C). Das Signal war jedoch sehr schwach und nur mit hoher Signalamplifizierung sichtbar, weshalb die Pilzhyphen in Abb. 34C stark überbelichtet erscheinen. Dennoch zeigte dieses Ergebnis, dass Stp1-mCherryHA in den Interaktionsraum diffundiert und sich dort ausbreitet.





**Abb. 34: Diffusion von sekretiertem Stp1-mCherryHA in den Apoplasten.** **A:** Schematische Darstellung des Effektes der Plasmolyse auf den pflanzlichen Apoplasten. **B:** Lokalisierung von Stp1-mCherryHA nach SG200stp1-mCherryHA Infektion in Pflanzenzellen mit physiologischem Turgordruck. Pfeile deuten auf Orte, an denen sich das Signal in den Interaktionsräumen ausbreitet. Es handelt sich bei allen Bildern um Z-Stacks. **C:** Lokalisierung von Stp1-mCherryHA nach SG200stp1-mCherryHA Infektion in plasmolysierten Pflanzenzellen nach Zugabe von 1 M NaCl. Sternchen kennzeichnen vergrößerte Apoplasten infizierter Zellen. Exemplarisch wurde ein Raum mit offenen Pfeilen näher definiert. Der gelbe Pfeil kennzeichnet eine sphärische Struktur. Bilder in C wurden von G. Doehlemann aufgenommen. Die Bilder bilden jeweils eine Ebene des Pflanzengewebes ab. Der Größenstandard entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Neben dem apoplastischen mCherry-Signal konnten außerdem mit zunehmender Plasmolyse Signale in Form von sphärischen Strukturen detektiert werden (Abb. 34C). Um festzustellen, ob dieses eine für Stp1-mCherryHA spezifische Beobachtung war, wurde ein Stamm generiert, welcher mCherryHA unter der Kontrolle des *stp1*-Promotors mit Hilfe des Stp1-Signalpeptides sekretiert (SG200stp1(SP)mcherryHA). Nach Infektion von Maispflanzen und Induktion von Plasmolyse konnte in diesem Stamm eine vergleichbare Akkumulation der sphärischen Vesikel beobachtet werden, so dass es sich wahrscheinlich um ein durch die Plasmolyse ausgelöstes Artefakt handelte (nicht gezeigt).



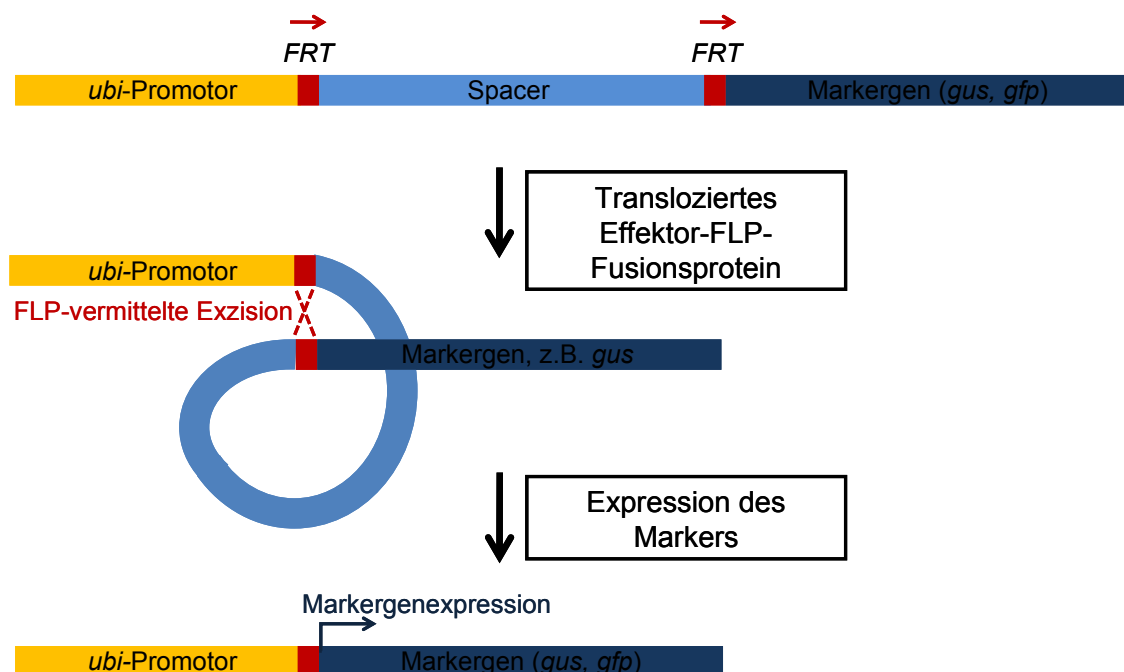
**Abb. 35: Immunpräzipitation von Stp1-HA und Stp1-mCherryHA aus infizierten Pflanzen.** Die Proteine wurden aus etwa 45 infizierten Pflanzen mittels Bindung an anti-HA-Antikörper drei Tage nach Infektion extrahiert. Als Größenkontrolle für Vollängen Stp1 wurden mit SG200stp1-HA infizierte Pflanzen verwendet; SG200stp1-mCherryHA wurde für die Extraktion des Stp1-mCherryHA Fusionsproteins infiziert.

Um zu kontrollieren, ob es sich bei dem visualisierten Protein um das Vollängen Fusionsprotein Stp1-mCherryHA handelte, oder ob das Protein gespalten wurde, wurden Immunpräzipitationen mit anti-HA Antikörpern durchgeführt (Abb. 35). In diesen Versuchen wurden im Gegensatz zu Stp1-HA für Stp1-mCherryHA lediglich schwache Vollängen-Banden erhalten. Stattdessen wurden Signale für C-terminale Abbauprodukte, sowie ein sehr starkes Signal für eine verkürzte mCherry-HA Version von etwa 20 kDa detektiert.

#### 2.9.4 FLP-vermittelter Nachweis der Translokation von Effektorproteinen

Zum Nachweis einer Translokation sekretierter *U. maydis* Proteine in die Pflanzenzelle wurde ein genetisches Testsystem entwickelt. Für diesen Ansatz wurde ein Stamm generiert, in dem *stp1* mit dem kodon-optimierten *FLP* Gen aus *S. cerevisiae* fusioniert war (SG200stp1-FLP).

Die Kodonoptimierung des *FLP* Gens für *U. maydis*, die effiziente Produktion und Funktionalität der Rekombinase in *U. maydis* war im Rahmen einer Dissertation bereits etabliert worden (Y. Khrunyk, pers. Mitteilung). Die Virulenz von SG200stp1-FLP wurde in Infektionsassays bestimmt (Tabelle 6, s. 2.9.1). Dabei zeigte sich, dass das Fusionsprotein nur partiell aktiv war und den apathogenen Phänotyp von SG200 $\Delta$ stp1 nur teilweise komplementieren konnte. Das Konzept dieses Ansatzes war, eine Translokation von FLP in die Pflanzenzelle über die Fusion an ein sekretiertes und transloziertes *U. maydis* Protein zu vermitteln (Abb. 36). In der Pflanzenzelle würde das Fusionsprotein über die Kernlokalisierungssequenz von FLP in den Nukleus gelangen, wo es aktiv ist. In Kooperation mit Dr. D. Becker (Universität Hamburg) wurden transgene Maispflanzen hergestellt, die im Genom ein Reportergen tragen, dessen Transkription erfolgt, sobald durch die Flipase ein inserierter „Spacer“ ausgeschnitten wird („flp out“ Technik; Abb. 36; Golic und Lindquist, 1989). Als Reportergene wurden sowohl *gfp* als auch  $\beta$ -Glucuronidase (*gus*) verwendet. Die *gus* oder *gfp* Expression sollte nach erfolgreicher Exzision des Spacers mikroskopisch direkt, oder im Falle von *gus* nach Inkubation mit dem artifiziellen Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronsäure (X-Gluc), nachgewiesen werden.



**Abb. 36: Schema der FLP-vermittelten Identifizierung translozierter *U. maydis* Effektoren.** Für diesen Ansatz wurden *U. maydis* Stämme generiert, die Effektorproteine, fusioniert an die für *U. maydis* optimierte FLP-Rekombinase aus *S. cerevisiae*, sekretieren. Wenn es sich dabei um Effektoren handelte, die in den Protoplast der Pflanzenzelle transloziert werden, so würde auch die FLP-Rekombinase hineingelangen. Das Fusionsprotein würde über die Kernlokalisierungssequenz der Flipase in den Nukleus gebracht, wo es durch Exzision eines genomischen Fragmentes zur Aktivierung eines Reporters kommt. In der Abbildung ist die Aktivierung der *gus* Expression dargestellt. Die GUS-Aktivität in Pflanzenzellen, in die ein Effektorfusionsprotein transloziert wurde kann nach Inkubation mit dem Substrat X-Gluc detektiert werden.

Es wurden 12 verschiedene transgene Pflanzenlinien, in denen vorab gezeigt wurde, dass eine transiente Transfektion mit einem FLP Gen zur Expression von GUS führt (D. Becker, pers. Mitteilung), mit SG200stp1-FLP infiziert. Nach 1, 2 und 4 Tagen wurden die infizierten Bereiche mikroskopiert. In keinem Fall konnte GUS-Aktivität in den infizierten Pflanzenbereichen detektiert werden. Auch eine cytoplasmatische GFP-Fluoreszenz konnte mikroskopisch nicht erkannt werden (nicht gezeigt).

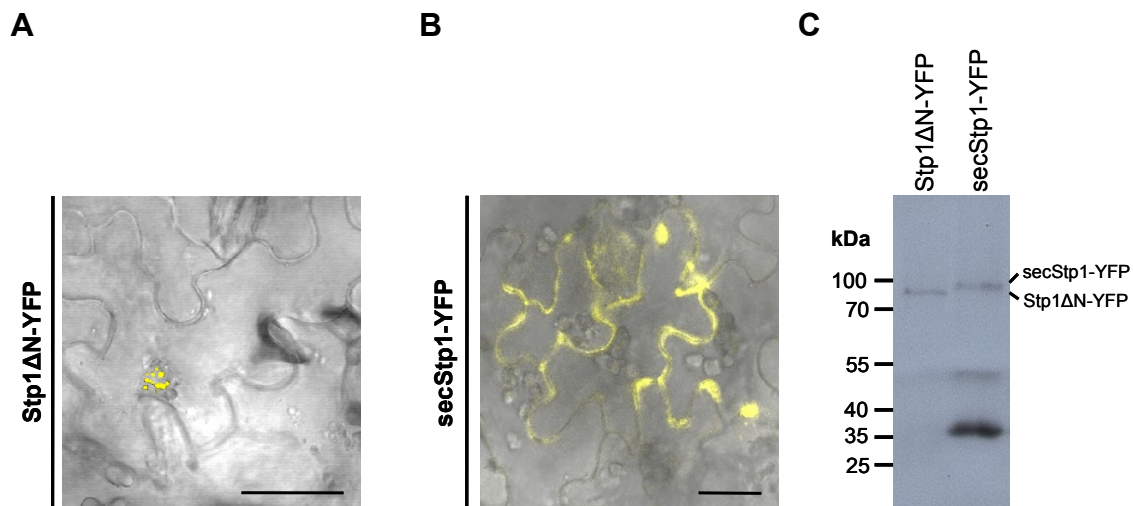
### **2.10 Transiente Expression, Sekretion und Re-Import Versuche von Stp1 in *Nicotiana benthamiana***

Ein Problem bei der Lokalisierung von Stp1-Fusionsproteinen nach Sekretion durch *U. maydis* während der biotrophen Phase war, dass die sekretierte Proteinmenge sehr gering war und durch Diffusion in den pflanzlichen Interzellularraum weiter ausgedünnt wurde. Auch SG200 $\Delta$ stp1 Stämme mit multiplen Integrationen von Konstrukten, wie beispielsweise p123-stp1mcherryHA, wiesen keine vermehrte Sekretion, sondern nur eine gesteigerte Akkumulation des Proteins innerhalb der Pilzhyphen auf (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde untersucht, wo das Stp1 Protein lokalisiert, wenn es in großen Mengen direkt in einer Pflanzenzelle produziert wird. Da keine Möglichkeit einer transienten Maistransformation zur Verfügung stand, wurde dazu die *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Expression in *N. benthamiana* verwendet. Die Expression von *stp1* erfolgte dabei unter Kontrolle des sehr starken 35S-Promotors, so dass große Proteinmengen synthetisiert werden sollten.

Hierfür wurde ein Plasmid konstruiert (pGreenII-stp1 $\Delta$ N-YFP), das für ein C-terminales Stp1-YFP-Fusionsprotein kodiert, in dem das Sekretionssignal von Stp1 deletiert ist (Stp1 $\Delta$ N-YFP). Nach transienter Transformation von *N. benthamiana* lokalisierte Stp1 $\Delta$ N-YFP sehr spezifisch in runden Körperchen (Subkompartimenten) im Nukleus der Pflanzenzellen (Abb. 37A). Im Cytoplasma konnte Stp1 $\Delta$ N-YFP nicht detektiert werden. Als Kontrolle wurde das Plasmid pGreenII-YFP verwendet, in dem YFP an den 35S-Promotor fusioniert ist. Wenn pGreenII-YFP transient in *N. benthamiana* eingebracht wurde, lokalisierte YFP gleichförmig im Cytoplasma und Zellkern (nicht gezeigt).

Für die sekretierten und ins Wirtspflanzenzytoplasma translozierten RXLR-Effektoren Avr1b und ATR13 aus *Phytophthora sp.* konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass sie aus dem Apoplasten auch in Abwesenheit des Pathogens in die Pflanzenzelle aufgenommen werden (Allen *et al.*, 2004; Dou *et al.*, 2008). Um herauszufinden, ob in Tabakzellen synthetisiertes Stp1 nach Sekretion im Apoplasten verbleibt oder re-importiert wird, wurde das Plasmid pGreenII-stp1-YFP konstruiert, das für ein Stp1-YFP Fusionsprotein kodiert, in dem das Stp1

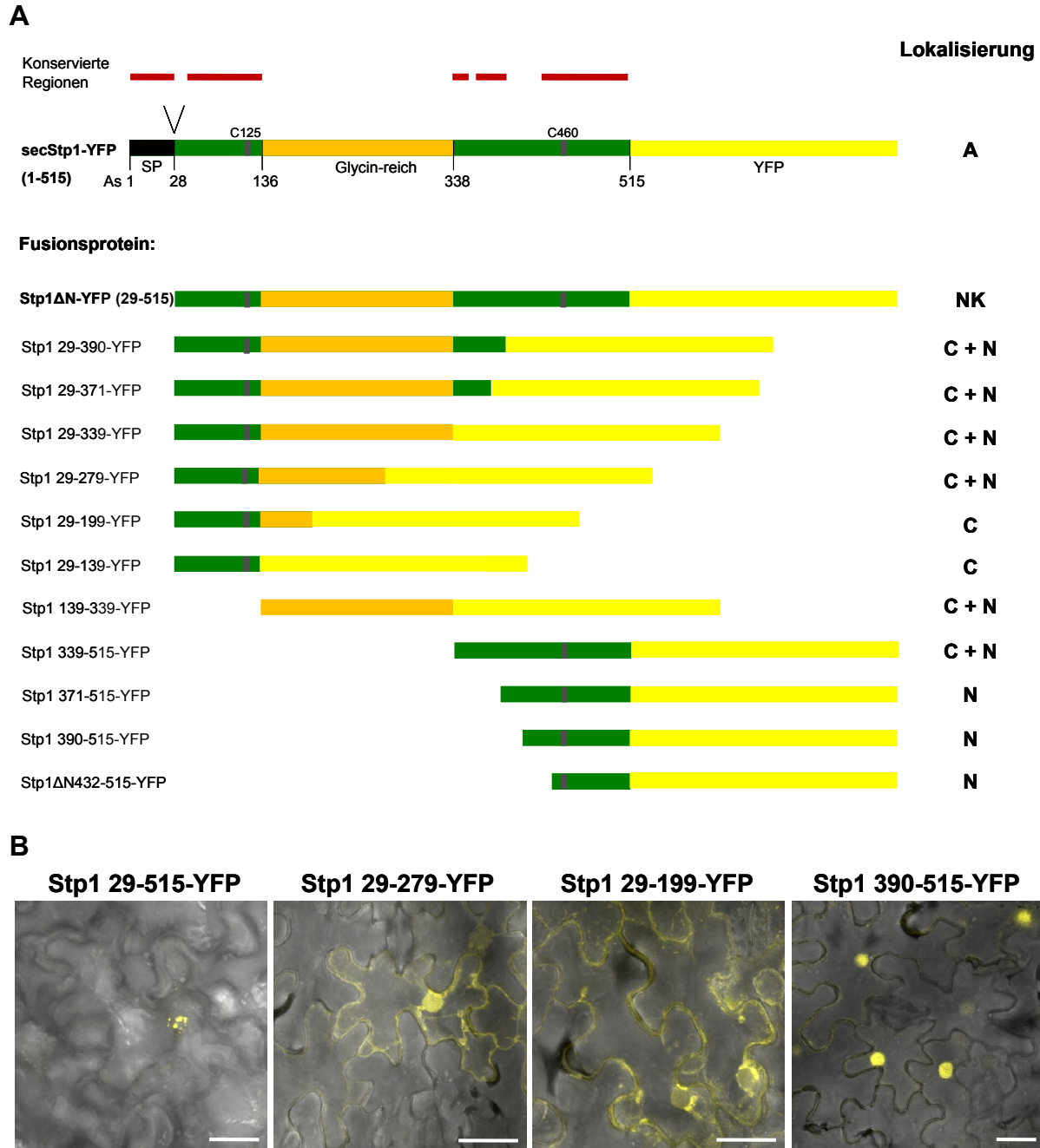
Sekretionssignal vorhanden ist. Nach Einbringen in *N. benthamiana* nach *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation konnte das Fusionsprotein mikroskopisch im Apoplasten transformierter Zellen nachgewiesen werden (Abb. 37B). Allerdings war die Fluoreszenz im Vergleich zu intrazellulär lokalisierendem Stp1 $\Delta$ N-YFP schwach, und es konnte kein Re-Import in die Pflanzenzelle beobachtet werden (Abb. 37B). Aus transient transformierten Blättern wurden Extrakte hergestellt, um die Integrität der Fusionsproteine nachweisen zu können. Im Western Blot mit YFP-spezifischen Antikörpern waren beide Proteine in voller Länge detektierbar; secStp1-YFP zeigte jedoch im Vergleich zu Stp1 $\Delta$ N-YFP eine leicht erhöhte Masse, die auf die Präsenz des Signalpeptides oder post-translationale Modifikationen zurückzuführen sein könnte (Abb. 37C). Zusätzlich waren hier zwei C-terminal verkürzte Fragmente erkennbar.



**Abb. 37: Transiente *A. tumefaciens*-vermittelte Expression von Stp1 $\Delta$ N-YFP und Stp1-YFP in *N. benthamiana*.** Die beiden Proteine wurden als YFP-Fusionsproteine hergestellt und entsprechend transformierte Tabakblätter mit konfokaler Mikroskopie untersucht. Es handelt sich in A und B jeweils um Überlagerungen des DIC- und des YFP-Kanals. Stp1-YFP-Derivate sind in gelb dargestellt. Der Größenstandard entspricht 25  $\mu$ m. **A:** Stp1 $\Delta$ N-YFP lokalisiert in Subkompartimenten der Nuklei der Tabakzellen. **B:** secStp1-YFP zeigt eine schwache Fluoreszenz im Apoplasten transformierter Tabakzellen und in intrazellulären Strukturen, die möglicherweise durch ein überlastetes Sekretionssystem (ER) entstehen. **C:** Immunblot zur Detektion von Stp1 in Tabakproteinextrakten mit anti-GFP Antikörpern.

Um herauszufinden, welche Teile des Stp1 $\Delta$ N-Proteins für die Bildung der Subkompartimente im Nukleus benötigt werden, wurden verschiedene Konstrukte in pGreenII hergestellt, die für verkürzte Stp1 $\Delta$ N Versionen bzw. für einzelne Domänen des Proteins kodieren und an YFP fusioniert sind (Abb. 38A). Wie zuvor wurden die Bereiche anhand der Aminosäurevergleiche von UmStp1, SrStp1 und UhStp1 ausgewählt (Abb. 38A oben). Nach der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation der generierten Plasmide in *N. benthamiana* wurde die Lokalisierung der Peptide mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht (Abb. 38B). Keines der verkürzten Stp1-Fusionsproteine lokalisierte wie Stp1 $\Delta$ N

in nukleären Subkompartimenten. C-terminal verkürzte Stp1-YFP Versionen, denen die Aminosäuren 279 bis 515 vom C-Terminus fehlten, zeigten eine gleichförmige Verteilung im Zellkern und Cytoplasma (Abb. 38B u. nicht gezeigt).



**Abb. 38: Stp1ΔN Versionen und Domänen die nach *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation in *N. benthamiana* produziert wurden. A:** Die unterschiedlichen Peptide wurden als YFP-Fusionsproteine in Tabak hergestellt. Die Auswahl der Bereiche richtete sich vor allem nach den in SrStp1 und UhStp1 konservierten Regionen. Lokalisierung der in A gezeigten Proteine in *N. benthamiana*: A: apoplastisch; NK: Körperchen im Nukleus; N: ausschließlich Nukleus; C+N: cytoplasmatisch und nuklear; C: vorwiegend cytoplasmatisch. **B:** Beispiele der transienten *A. tumefaciens*-vermittelten Produktion von Stp1 sowie verkürzter Stp1ΔN-Versionen und einzelner Domänen in *N. benthamiana*. Alle Proteine wurden als YFP-Fusionsproteine produziert (gelb). Der Größenstandard entspricht 25 μm.

Fusionsproteine mit größeren C-terminalen Deletionen lokalisierten dagegen vorwiegend im Cytoplasma (Abb. 38C u. nicht gezeigt). Die Anwesenheit der Glycin-reichen Region (As 139-339) oder des C-Terminus (As 339-515) vermittelten die Lokalisierung des Fusionsproteins im Cytoplasma und Zellkern (Abb. 38B). Kurze C-terminale Bereiche von Stp1 (As 371-515) vermittelten eine überwiegend nukleare Lokalisierung des Fusionsproteins. Diese Ergebnisse deuten an, dass der C-Terminus von Stp1 in *N. benthamiana* für den Transfer in den Nukleus verantwortlich ist. Die Kernkörperchen jedoch können nur gebildet werden, wenn zusätzliche, noch nicht identifizierte Bereiche des Proteins vorhanden sind.

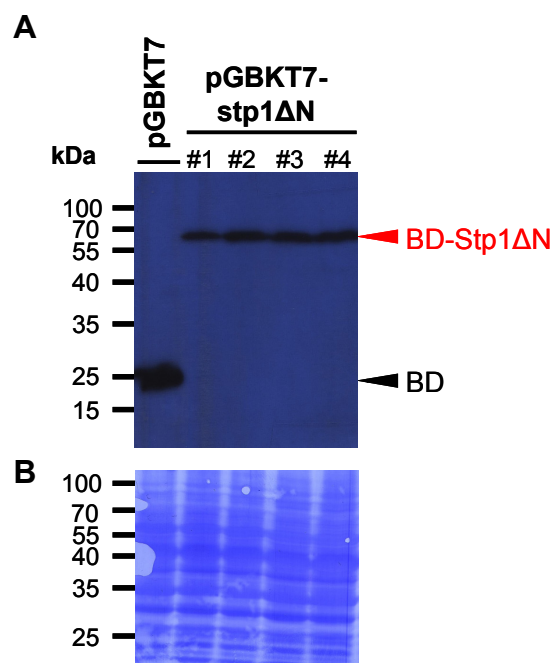
## 2.11 Identifizierung von Stp1 Interaktionspartnern

Um Anhaltspunkte für die Funktion des essentiellen Virulenzfaktors Stp1 zu erhalten ist die Identifizierung von Proteinen, die während der biotrophen Entwicklungsphase mit Stp1 interagieren, wichtig. Aus diesem Grund wurde eine Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsanalyse durchgeführt, bei der Stp1 $\Delta$ N als Köderprotein verwendet wurde.

### 2.11.1 Identifizierung von Stp1 Interaktionspartnern über Hefe-Zwei-Hybrid Analyse

Eine cDNA-Bibliothek, die aus infiziertem Maisgewebe hergestellt worden war, wurde mit Stp1 $\Delta$ N als Köderprotein nach potentiellen Interaktionspartnern (Beuteproteinen) durchsucht. Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek war RNA nach zwei bzw. fünf Tagen aus infizierten Maispflanzen isoliert worden (Stratagene Phagemid Bibliothek; Farsing, 2003). Diese Bibliothek sollte somit sowohl für interagierende *U. maydis* als auch *Z. mays* Proteine kodieren. Für die Interaktionsanalyse wurde das Plasmid pGBKT7-stp1 $\Delta$ N konstruiert, das für Stp1 $\Delta$ N als N-terminale Fusion mit der Bindedomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors kodiert (BD-Stp1 $\Delta$ N). Zunächst musste kontrolliert werden, ob das Fusionsprotein in dem für die Interaktionsanalyse verwendeten *S. cerevisiae* Stamm AH109 korrekt synthetisiert wurde. Dazu wurden verschiedene pGBKT7-stp1 $\Delta$ N Transformanten in entsprechendem Selektionsmedium angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und nach einem Proteinaufschluss mittels Immunblot mit anti-Bindedomänen Antikörpern (anti-BD) analysiert (Abb. 39). Das Protein BD-Stp1 $\Delta$ N konnte in allen untersuchten Transformanten in der erwarteten Größe von etwa 69 kDa detektiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1* durch die Expression von *stp1* nicht autoaktiviert wurden (nicht gezeigt). Daher waren die Voraussetzungen zur Verwendung von Stp1 $\Delta$ N als Köderprotein für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse erbracht.

Nach Transformation der Bibliothek, in der die cDNAs 5'-terminal mit der Sequenz für die Gal4 Transkriptionsfaktor-Aktivierungsdomäne fusioniert vorliegen, in den Stamm AH109/pGBKT7-stp1ΔN#2 wurden die Zellen auf Minimalmedium (SD-Trp-Leu) ausplattiert. Dabei wurde auf die Präsenz von Köder- und Beuteplasmid selektioniert. Die erzielte Transformationseffizienz lag bei etwa  $7,5 \times 10^3$  CFU/μg DNA. Insgesamt wurden etwa  $7,5 \times 10^5$  Klone erhalten. Zunächst wurden alle Transformanden geerntet, gut durchmischt, aliquotiert und eingefroren. Um auf Interaktion zwischen Köder und Beute zu selektionieren, wurden die Transformanden auf hoch selektivem Medium ausplattiert (Hochstringenzmedium: SD-Trp-Leu-His-Ade). Auf diesem können nur Transformanden wachsen, die aufgrund einer Interaktion von BD-Stp1ΔN mit einem Beuteprotein die Transkription der Auxotrophiemarker *HIS3* und *ADE2* ermöglichen.



**Abb. 39: Produktion des BD-Stp1ΔN-Fusionsproteins in *S. cerevisiae* AH109.** Der Stamm AH109 wurde mit dem Plasmid pGBKT7-stp1ΔN transformiert und in Selektionsmedium angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden identische Zellmengen geerntet, Proteine extrahiert und im Immunblot mit anti-BD Antikörpern analysiert. Die erwartete Größe des Fusionsproteins war 69 kDa (roter Pfeil). AH109/pGBKT7 wurde zur Kontrolle ebenfalls analysiert und zeigte die erwartete Bande der Bindedomäne bei 26 kDa (schwarzer Pfeil). **A:** Detektion des BD-Stp1ΔN Fusionsproteins mit anti-BD-Antikörpern. **B:** Färbung des Blots mit Comassie Blau als Ladekontrolle.

Insgesamt wurden ca. 250 Transformanden, die auf Hochstringenzmedium wachsen konnten, analysiert. Dazu wurde die Region der pAD4-24 Beuteplasmide durch PCR amplifiziert, in der die entsprechenden cDNAs inseriert worden waren. Nach *Hae*III Restriktion der PCR-Produkte wurden Plasmide mit unterschiedlichen Restriktionsmustern sequenziert. Dabei konnten lediglich sechs unterschiedliche Beuteplasmide isoliert werden (Tabelle 7). 50% aller, bei hoher Stringenz wachsenden Zellen, synthetisierten ein *U. maydis* Beuteprotein



(Um05761 (Peb1); EB1-ähnliches Protein). Bei Retransformation in *S. cerevisiae* bewirkten die entsprechenden Plasmide eine Autoaktivierung des *GAL4*-Promotors und waren daher als falsch-positiv anzusehen. Bei den fünf anderen Stp1 Interaktionspartnern handelte es sich um Maisproteine (*Stp1* interaction partner; SIP). Keines dieser Proteine wies ein N-terminales Signalpeptid auf, so dass es sich um intrazelluläre Pflanzenproteine handeln musste. Die Plasmide, die für die Beuteproteine kodieren, bewirkten nach Retransformation in *S. cerevisiae* keine Autoaktivierung des *GAL4*-Promotors. Für das Plasmid pAD-Sip2, das für die putative Adenylat-Kinase Sip2 kodiert, wurde dies nicht getestet, da eine Interaktion von Stp1 mit einem chloroplastidären Enzym unwahrscheinlich erschien. Bei Sip10 handelte es sich um ein putatives Myrosinase-Vorläuferprotein. Außerdem kodierten die identifizierten Sequenzen für zwei nukleare Proteine, eine RING-H2-E3-Ubiquitin-Ligase (Sip12) und ein Protein mit DNA-Bindedomänen und einer Methyl-CpG-Domäne (Sip29), das möglicherweise in die transkriptionelle Genregulation involviert ist. Für Sip31 konnten keine homologen Proteine gefunden werden, jedoch enthält dieses Protein eine DnaJ-Chaperondomäne.

Tabelle 7: Im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierte Interaktionspartner von Stp1<sup>1</sup>.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Proteinannotation /Homologien (Lokalisierung)</b>
<b>Sip2</b>	Adenylat-Kinase Adk1; P43188 (chloroplastidär); 8x
<b>Sip10</b>	homolog zum Myrosinase-Vorläufer NP_001061842 ( <i>Oryza sativa</i> ) (Myrosinasezellen; vakuolar; cytoplasmatisch); 15x
<b>Sip12</b>	RING-E3 Ubiquitin-Ligase; NP_001054683; homolog zu Vip2 ( <i>Avena fatua</i> ) (cytoplasmatisch, nuklear); 45x
<b>Sip29</b>	potentieller Transkriptionsfaktor/MBD Protein; homolog zu EAZ41867 ( <i>Oryza sativa</i> )(nuklear); 37x
<b>Sip31</b>	unbekanntes Protein mit Chaperondomäne (cytoplasmatisch); 3x

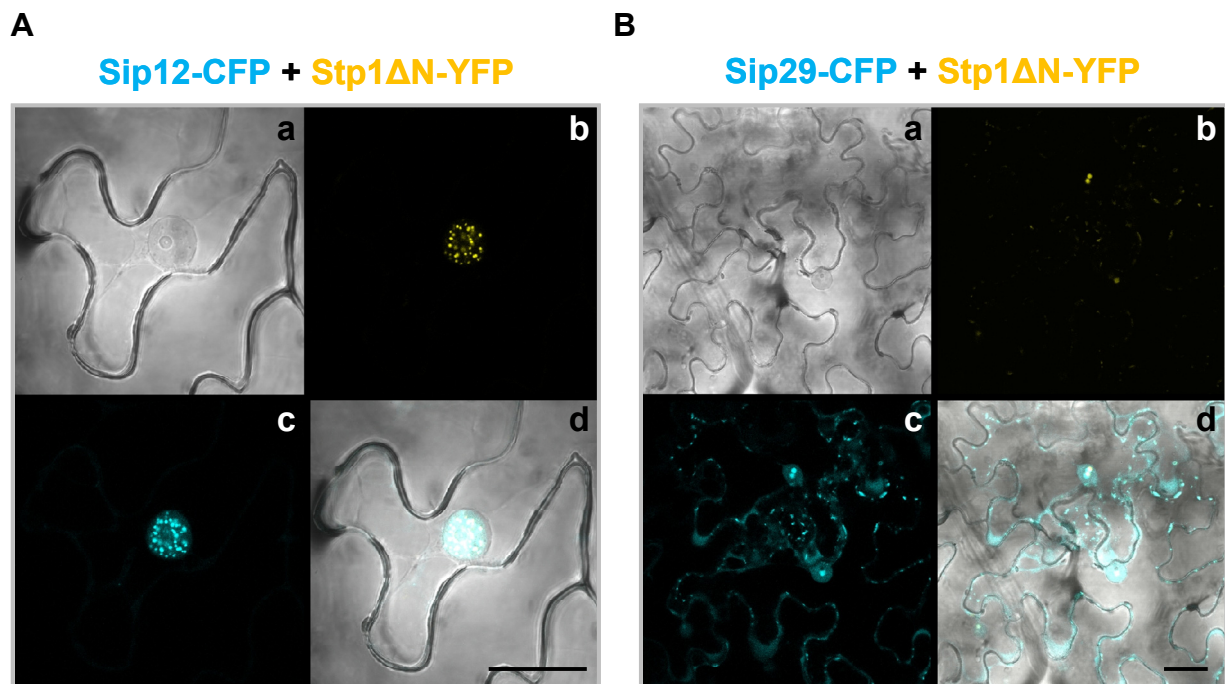
<sup>1</sup> Die aufgelisteten Sip-Proteine (Sip: *Stp1* Interaktionspartner) konnten unter Hochstringenzbedingungen identifiziert werden und zeigten keine Autoaktivierung des *GAL4*-Promotors. Neben der Bezeichnung ist die Annotation angegeben und die bioinformatisch ermittelte putative Lokalisierung des Proteins sowie die Anzahl isolierter Clone des jeweiligen Sips.

### 2.11.2 Co-Expression von Stp1ΔN und pflanzlichen Interaktionspartnern in *N. benthamiana*

Um die Stp1 Interaktionen mit den in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse identifizierten Proteinen zu stützen, wurden diese zusammen mit Stp1ΔN-YFP in *N. benthamiana* exprimiert und bezüglich ihrer Colokalisierung überprüft. Da es nicht gelang, die vollständigen offenen Leseraster aus der cDNA-Bibliothek zu amplifizieren, wurden lediglich die im Beutepiasmid befindlichen Sequenzfragmente verwendet und mit dem Gen für das Cyan-fluoreszierende

Protein CFP fusioniert. Für die Expression in *N. benthamiana* wurden Sip10, Sip12, Sip29 und Sip31 verwendet (Plasmide pAD-Sip10, pAD-Sip12, pAD-Sip29 und pAD-Sip31). Sip2 wurde nicht in diesem System getestet, da eine Interaktion von Stp1 mit einem chloroplastidären Enzym unwahrscheinlich erschien. Nach Einbringen der Konstrukte in *N. benthamiana* über *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation wurde die Lokalisierung der Fusionsproteine mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

Für Sip10-CFP sowie Sip31-CFP konnte keine Colokalisierung mit Stp1ΔN-YFP festgestellt werden. Beide Fusionsproteine wiesen eine gleichförmige Verteilung im Cytoplasma sowie im Zellkern der Tabakzellen auf (nicht gezeigt). Sip12-CFP dagegen zeigte eine vollständige Colokalisierung mit Stp1ΔN-YFP in Subkompartimenten des Nukleus (Abb. 40A). Zusätzlich war das Sip12-CFP auch in kleinen Kompartimenten im Cytosol der Zellen detektierbar. Auch in Abwesenheit von Stp1ΔN lokalisierte dieses Protein in nuklearen sowie cytoplasmatischen Kompartimenten. Sip29-CFP zeigte dagegen eine partielle Colokalisierung mit Stp1ΔN-YFP im Nukleus. Das Protein war bei alleiniger Expression gleichförmig in Cytoplasma und Zellkern verteilt, akkumulierte jedoch in Gegenwart von Stp1ΔN-YFP in Form von größeren Aggregaten im Zellkern (Abb. 40B). Die Colokalisierung von Sip12 und Sip29 mit Stp1 unterstützt die Relevanz der in der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse beobachteten Interaktionen.

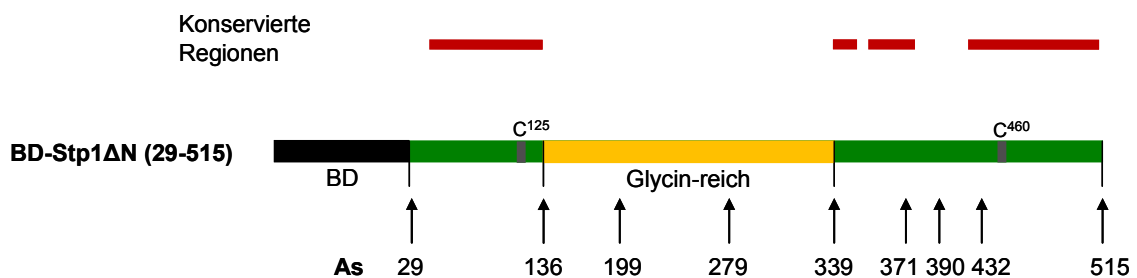


**Abb. 40: Heterologe Co-Expression von *sip12* und *sip29* mit *stp1ΔN* in *N. benthamiana*.** **A:** Colokalisierung von Stp1ΔN-YFP und Sip12-CFP. **B:** Colokalisierung von Stp1ΔN- und Sip29-CFP. **a:** DIC-Mikroskopie; **b:** YFP-Kanal zur Detektion von Stp1ΔN-YFP; **c:** CFP-Kanal zur Detektion der Sip-CFPs; **d:** DIC-Mikroskopie überlagert vom YFP- und CFP-Kanal. Der Größenstandard entspricht 25 μm.

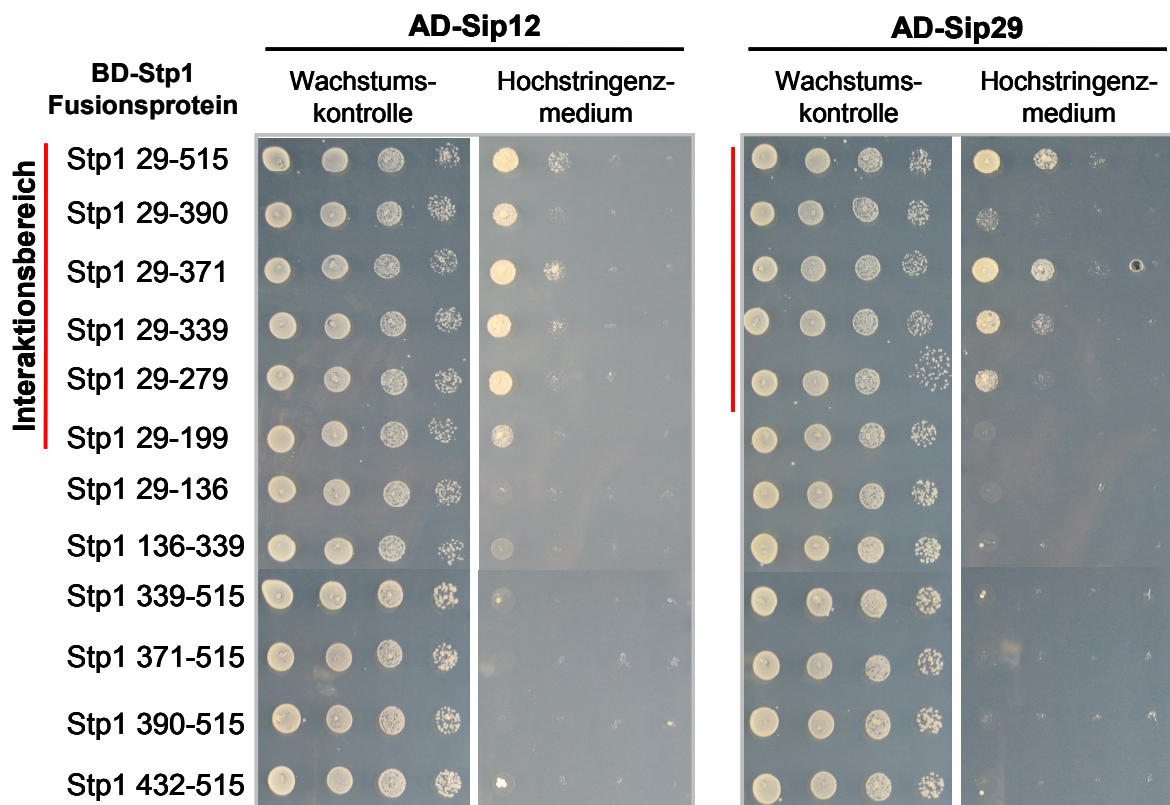
### 2.11.3 Identifizierung von Sip12 und Sip29 Interaktionsdomänen in Stp1

In Co-Expressionsversuchen in *N. benthamiana* wurde festgestellt, dass Stp1 in dem heterologen System vollständig mit Sip29 sowie partiell mit Sip12 colokalisiert. Aus diesem Grund wurde die Wechselwirkung von Stp1 mit diesen zwei Proteinen näher charakterisiert. Das Ziel war dabei, die jeweilige Interaktionsdomäne in Stp1 zu identifizieren. Dazu wurden verkürzte Versionen sowie einzelne Domänen von Stp1 bezüglich der Interaktion mit Sip12 und Sip29 im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht.

**A**



**B**



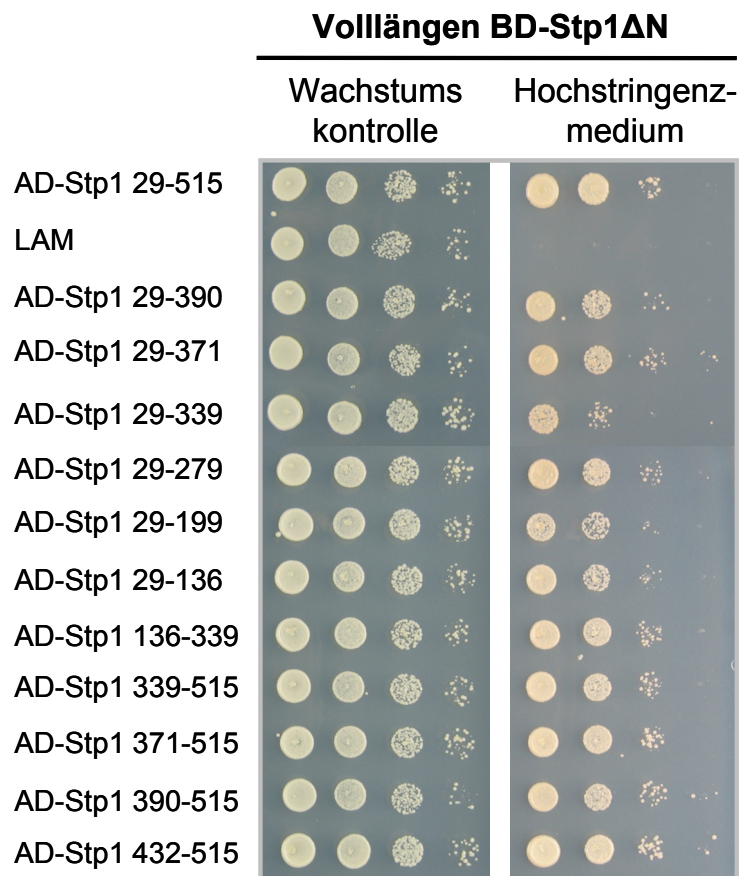
**Abb. 41: Identifizierung von Sip12 bzw. Sip29 Interaktionsdomänen in BD-Stp1ΔN mittels Zwei-Hybrid-Analyse. A:** Domänenstruktur von BD-Stp1ΔN. Pfeile bezeichnen Aminosäurepositionen, die für die in **B** bezüglich der Interaktion mit AD-Sip12 und AD-Sip29 untersuchten Proteinversionen bedeutend sind. **B:** Interaktion von AD-Sip12 sowie AD-Sip29 mit verschiedenen verkürzten BD-Stp1ΔN Proteinversionen. Die Interaktionen wurden auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-His-Ade) getestet. Als Wachstumskontrolle diente SD-Trp-Leu-Medium, das lediglich auf das Vorhandensein des Köder- und des Beuteplasmids selektioniert.

In Abb. 41 sind die Ergebnisse dieser Interaktionsstudien abgebildet (vgl. auch Abb. 38A). Die Interaktionsdomänen konnten für Sip12 auf den Bereich zwischen Aminosäure 29 und 199 von Stp1 eingegrenzt werden, für Sip29 wurde ein etwas größerer N-terminaler Bereich (As 29-279) für die Stp1 Interaktion identifiziert. Die Glycin-reiche Region (Stp1 136-339) allein vermittelte jedoch keine eindeutige Interaktion mit Sip12 oder Sip29. Die Produktion der verkürzten Stp1-BD Köder in *S. cerevisiae* wurde für durch Immunblot mit anti-AD Antikörpern nachgewiesen (Abb. 42B).

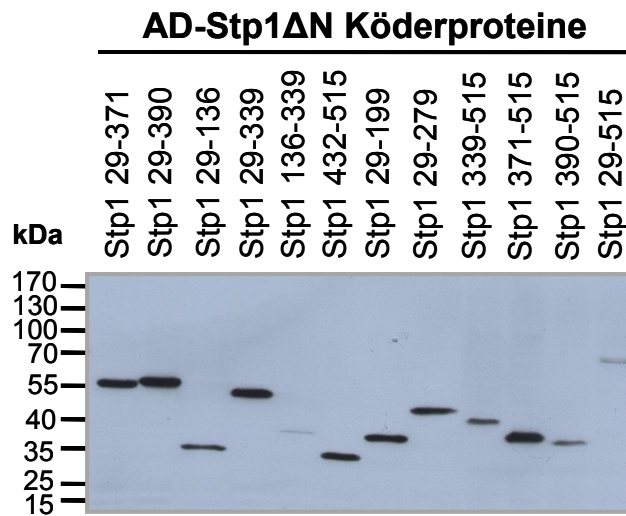
#### 2.11.4 Stp1 Selbstinteraktion in *S. cerevisiae*

Im Rahmen der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurde das Stp1 Protein auch auf Selbstinteraktion untersucht. Der Stamm AH109, transformiert mit dem Ködervektor pGBKT7-stp1 $\Delta$ N und dem Beutevektor pGADT7-stp1 $\Delta$ N wuchs sehr gut auf Hochstringenzmedium, d. h. es erfolgte eine klare Interaktion zwischen Stp1 Molekülen (Abb. 42A).

**A**



B



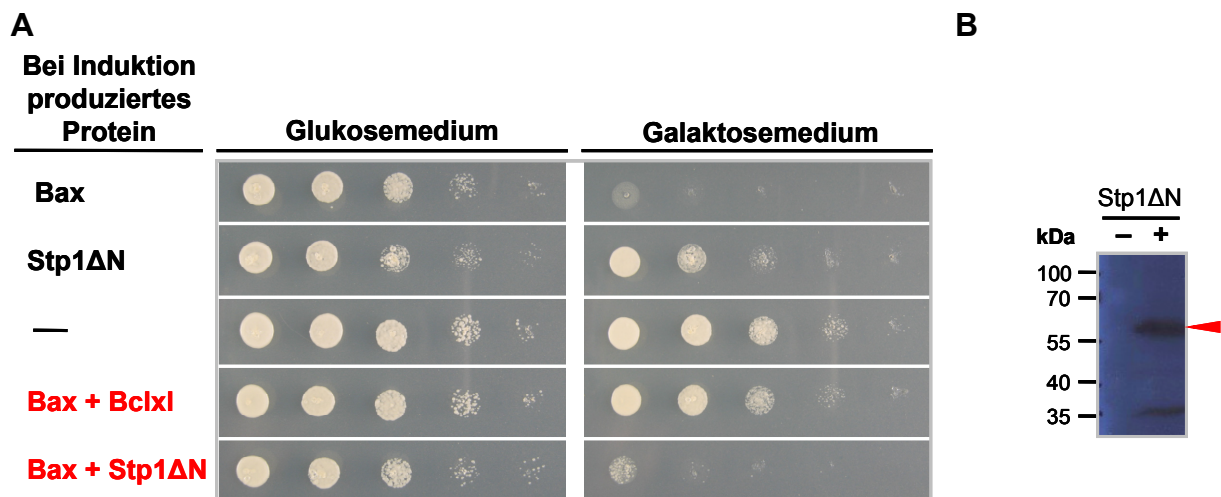
**Abb. 42: Selbstinteraktion von Stp1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System.** **A:** Interaktionen von BD-Stp1ΔN mit verschiedenen verkürzten AD-Stp1 Proteinversionen sowie einzelnen Stp1ΔN-Domänen. Die Interaktion wurde auf Hochstringenzmedium (SD-Leu-Trp-His-Ade) getestet. Als Wachstumskontrolle diente SD-Trp-Leu-Medium, das lediglich auf das Vorhandensein des Köder- und des Beuteplasmids selektioniert. Die Expression zusammen mit dem LAM-Protein diente als Negativ-Kontrolle. **B:** Immunblot mit anti-AD Antikörpern, mit dem die effiziente Produktion der verschiedenen AD-Stp1ΔN Proteinversionen überprüft wurde.

Um zu analysieren, welche Teile des Proteins für diese Selbstinteraktion verantwortlich sind, wurden Gensequenzen, die für einzelne Domänen von Stp1 kodieren in den Beutevektor kloniert und bezüglich einer Interaktion mit Stp1ΔN untersucht. Die exprimierten Proteinversionen sind in Abb. 41A gezeigt (vgl. auch Abb. 38A). Ihre effiziente Produktion in *S. cerevisiae* wurde für alle Versionen durch Immunblot mit anti-AD Antikörpern nachgewiesen (Abb. 42B). In allen Fällen konnte unter Hochstringenzbedingungen eine klare Interaktion mit Stp1ΔN festgestellt werden (Abb. 42A). Im Vergleich mit der Interaktion zweier Vollängen Stp1 Proteine konnte eine leicht abgeschwächte Interaktion beobachtet werden, wenn Teile des C-Terminus oder der zentrale Teil des Proteins fehlten (Abb. 42A). Dies zeigt, dass die Selbstinteraktion über weite Bereiche des Proteins vermittelt werden kann.

## 2.12 Effekte von Stp1 auf Bax-induzierten Zelltod in *S. cerevisiae*

In Infektionen von Maispflanzen mit der *stp1* Deletionsmutante wurde eine hypersensitive Pflanzenabwehrantwort mit Apoptose-ähnlichem programmiertem Zelltod infizierter Pflanzenzellen beobachtet (vgl. 2.4). Die Anwesenheit des Effektors Stp1 schien folglich essentiell für die Suppression dieser Abwehr zu sein. Um zu testen, ob Stp1 in der Lage ist, Bax-induzierte Apoptose zu inhibieren, wurde ein Hefesystem verwendet (Ligr *et al.*, 1998).

Aufgrund der konservierten Funktionalität des Zelltod-regulierenden Proteins Bax, das ursprünglich aus Mäusen isoliert wurde, führt die Produktion dieses Proteins auch in heterologen Systemen, wie etwa Pflanzen (Pannell und Lamb, 1997) oder *S. cerevisiae* (Madeo *et al.*, 1999), zur Induktion von apoptotischem Zelltod. Bax gehört zur Bcl2-Familie (B-cell lymphoma 2) Apoptose-regulierender Proteine, in der sowohl pro-apoptotische (wie Bax) als auch anti-apoptotische Proteine (z. B. Bclxl) vertreten sind. Die gleichzeitige Synthese eines anti-apoptotischen Proteins wie Bclxl, das ebenfalls aus Säugern isoliert wurde, kann die Apoptoseinduktion durch Bax stoppen und die betreffende Zelle überlebt. Es sind bereits einige Effektoren bekannt, die in der Lage sind, den Bax-induzierten Zelltod zu unterdrücken und so die Wirtszellabwehr aufzuhalten (z. B. Avr1b aus *Phytophthora sojae*; Dou *et al.*, 2008).



**Abb. 43: Stp1-vermittelte Apoptose-Inhibition in *S. cerevisiae*.** **A:** *bax*, *bclxl* und *stp1ΔN* wurden in unterschiedlichen Kombinationen in *S. cerevisiae* YHUM0472 exprimiert. Für die Transformationen wurden die entsprechenden Plasmide pBax, pB563-stp1ΔN sowie für Cotransformationen pBax und pBcl-xl sowie pBax und pB563-stp1ΔN verwendet. Als Leervektoren für Negativkontrollen dienten die Ausgangsplasmide p316 und pB563. Die Transkription der Gene wurde dabei jeweils durch Galaktose-induzierbare und Glukose-reprimierbare Promotoren reguliert (vgl. 4.9). **B:** Der Nachweis korrekter Produktion von Stp1ΔN in YHUM0423 erfolgte im Immunblot mit Stp1-spezifischen Antikörpern. Das Protein konnte vorwiegend in Volllänge detektiert werden (roter Pfeil). Als Kontrolle diente der Stamm YHUM0423 ohne Plasmid.

Die korrekte und effiziente Produktion des Stp1ΔN Proteins wurde durch einen Immunblot mit Stp1-spezifischen Antikörpern gezeigt (Abb. 43B). Bei dem Apoptose-Inhibitionstest konnte das Bax-induzierte Sterben der Hefezellen nicht durch eine gleichzeitige Produktion von Stp1ΔN unterdrückt werden (Abb. 43A). Bei gleichzeitiger Synthese des Inhibitors Bcl-xl dagegen überlebten die Zellen. Stp1ΔN konnte folglich den Bax-induzierten Zelltod in *S. cerevisiae* nicht supprimieren.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1 Die Rolle des Clusters 5B für die biotrophe Entwicklung von *U. maydis*

In dieser Arbeit wurde das Gencluster 5B aus *U. maydis* charakterisiert. Dieses Cluster kodiert für drei vorhergesagt sekretierte Proteine. Die Deletion des gesamten Clusters in dem solopathogenen Stamm SG200 führte in Maisinfektionen zu einem kompletten Virulenzverlust (Kämper *et al.*, 2006). Durch Einzel- und Doppelgendeletionen der drei Clustergene sowie durch Komplementation konnte *stp1* (*um02475*) eindeutig für diesen Phänotyp verantwortlich gemacht werden (vgl. Kapitel 2.2). Für die zwei anderen paralogen Gene, *um02473* und *um02474*, konnte keine Relevanz für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* nachgewiesen werden. Sowohl *SG200Δum02473Δum02474* als auch *CL13Δum02473Δum02474* Stämme zeigten in Maisinfektionen keinen Pathogenitätsunterschied im Vergleich zur Infektion mit dem jeweiligen Ausgangsstamm. In *CL13* sind Pathogenitäts-assoziierte Deletionsphänotypen, wie beispielsweise die Hypervirulenz nach Deletion der Virulenz-attenuierenden Gene *vcp1* und *vcp2*, im Vergleich zu den entsprechenden SG200 Mutanten stärker ausgeprägt (K. Heidrich, pers. Mitteilung). Eine Rolle von *um02473* und *um02474* für *U. maydis* auf Early Golden Bantam konnte folglich ausgeschlossen werden. Offen ist jedoch, ob die Gene *um02473* und *um02474* Virulenzfunktion besitzen, wenn andere Maisvarietäten infiziert werden.

Das Gen *um02473* zeigte im Gegensatz zu *um02474* in Microarray-Analysen keine Induktion während des biotrophen Wachstums (Kämper *et al.*, 2006), was eine spezifische Bedeutung während dieser Phase fragwürdig macht. Der N-terminale Bereich von *Um02474* weist signifikante Ähnlichkeit zu *Um02473* auf (28% Identität). Möglicherweise sind die Gene aus einer Duplikation hervorgegangen, bei der die N-terminale Domäne konserviert blieb. In den verwandten Basidiomyceten *S. reilianum* und *U. hordei* ist dagegen jeweils nur ein *um02473* Ortholog vorhanden (J. Schöning und J. Schirawski, pers. Mitteilung). Die schwache Konservierung der Effektoren deutet darauf hin, dass sie einem starken diversifizierenden Selektionsdruck unterliegen (Wapinski *et al.*, 2007). Das Ortholog von *Um02473* in *U. hordei* enthält ein Stopkodon an Aminosäure-Position 6, obwohl es über die gesamte Länge Homologien zu den Orthologen in *S. reilianum* und *U. maydis* aufweist. Dies weist darauf hin, dass das Protein in diesem Organismus nicht mehr benötigt wird. Das Auftreten von Stopkodons in *U. hordei* Genen, die für sekretierte Proteine kodieren, für die es Orthologe in *U. maydis* und *S. reilianum* gibt, konnte mehrfach beobachtet werden und könnte darauf zurückzuführen sein, dass *U. hordei* nicht *Z. mays* sondern *Hordeum sp.* infiziert (J. Schirawski und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

Über die Funktionen der Gene *um02473* und *um02474* aus Cluster 5B läßt sich aufgrund des fehlenden Phänotyps der Deletionsmutanten nur schwer spekulieren. Es ist zudem möglich, dass die Deletionsmutanten einen Phänotyp haben, der nicht durch die im Labor standardmäßig durchgeführten Infektionstests erkannt werden kann. Eine Erklärung für den nicht erkennbaren Phänotyp nach Deletion von *um02473* und *um02474* könnte sein, dass diese Gene in der verwendeten Maisvarietät Early Golden Bantam keine Funktion erfüllen, in anderen Maisvarietäten jedoch für die pathogene Entwicklung benötigt werden. Um dies herauszufinden, müssten verschiedene Maisvarietäten bezüglich der Virulenz von *CL13Δum02473Δum02474* im Vergleich zu *CL13* untersucht werden.

In einigen anderen Genclustern für sekretierte Proteine in *U. maydis* ist der Deletionsphänotyp auf mehr als ein Gen zurückzuführen. Beispielsweise konnte der hypervirulente Phänotyp der Cluster 2A Deletionsmutante auf einen additiven Effekt der zwei Haupteffektoren *Vcp1* und *Vcp2* eingegrenzt werden (K. Heidrich, pers. Mitteilung). Auch im *pit* Gencluster wurden mit *Pit1* und *Pit2* zwei Effektoren der Pathogenität identifiziert (M. Fleckenstein und G. Doehleemann, pers. Mitteilung). Im Unterschied zu den Virulenz-attenuierenden Genen *vcp1* und *vcp2* wurde für *pit1* und *pit2* beobachtet, dass bereits Einzelgendeletionen dramatische Auswirkungen auf die Pathogenität haben. Es wird vermutet, dass sie in einem Signalweg agieren könnten (G. Doehleemann, S. Reissmann und R. Kahmann, pers. Mitteilung). In dem 23 Gene umfassenden Cluster 19A wurden sieben Effektoren identifiziert, die gemeinsam die Tumorbildung bewirken. Hier handelt es sich vermutlich, ähnlich wie in bakteriellen Pathogenitätsinseln (Hacker und Kaper, 2000), um ein ganzes Set verschiedener Effektorgene. Die jeweiligen Einzelgendeletionen beeinflussen die Pathogenität nur geringfügig (T. Brefort und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

### **3.2 Stp1 – ein in Brandpilzen konservierter Virulenzfaktor?**

Für *stp1* konnte nicht nur im solopathogenen Stamm SG200, sondern auch in Kreuzungen der kompatiblen Wildtypstämme FB1 und FB2 eine essentielle Funktion für die pathogene Entwicklung gezeigt werden (vgl. Kapitel 2.2). Dies bedeutet, dass es sich bei *Stp1* um einen Virulenzfaktor von *U. maydis* handelt, bei dessen Abwesenheit der Pilz keine kompatible Interaktion mit der Wirtspflanze eingehen kann. Bislang wurde nur ein anderes sekretiertes *U. maydis* Protein, *Pep1*, identifiziert, das in gleichem Maße essentiell für erfolgreiche Pflanzeninfektionen ist (Doehleemann *et al.*, 2009). Auch *pep1* Deletionsmutanten bilden in Pflanzeninfektionen keine Tumore aus. Deletionsmutanten von anderen bislang bearbeiteten Genen für sekretierte Proteine weisen ebenfalls Pathogenitätsdefekte auf, können aber



zumindest in eingeschränktem Maße in infiziertem Pflanzengewebe proliferieren (z. B. *pit1*, *pit2*, Cluster 6A sowie Cluster 19A; M. Fleckenstein, G. Doehlemann, A. Mendoza-Mendoza und T. Brefort, pers. Mitteilung). Interessanterweise konnten *stp1* Orthologe auch in den Brandpilzen *S. reilianum* und *U. hordei* identifiziert werden (J. Schöning, J. Schirawski und R. Kahmann, unveröffentlicht). Die Deletion von *stp1* in *S. reilianum* führte wie die Deletion in *U. maydis* zu einem apathogenen Phänotyp (J. Schöning und J. Schirawski, persönl. Mitteilung) und die Insertion von *srstp1* unter der Kontrolle des *umstp1* Promotors konnte den Stamm SG200 $\Delta$ *stp1* vollständig komplementieren (J. Schirawski, pers. Mitteilung). Dies zeigt, dass die beiden Gene identische Funktionen erfüllen. Zwar sind *S. reilianum* und *U. maydis* eng verwandte Pilze, die beide auf Mais parasitieren (Piepenbrink *et al.*, 2002), jedoch unterscheiden sich die Infektionsverläufe: *S. reilianum* verursacht im Gegensatz zu *U. maydis* systemische Infektionen und die Sporenbildung erfolgt ausschließlich in den männlichen und weiblichen Blüten (Hanna, 1929). Um festzustellen, ob die essentielle Funktion von *Stp1* auch unabhängig vom pflanzlichen Wirt konserviert ist, sollte das betreffende Gen auch in *U. hordei* deletiert und die resultierende Mutante in Pflanzeninfektionen analysiert werden. Da es sich bei *U. hordei* um ein Gerstenpathogen handelt, könnte dies Einblick geben, ob *Stp1* einen generellen Pathogenitätsfaktor in Brandpilzen darstellt, der für die Etablierung von kompatiblen biotrophen Interaktionen benötigt wird.

### 3.3 *Stp1* ist essentiell für die Proliferation von *U. maydis* in der Pflanze

Anhand von Wachstumsversuchen in axenischer Kultur konnte gezeigt werden, dass *stp1* Deletionsmutanten keinerlei Defekte während des saprophytischen Wachstums oder unter Stress-induzierenden Bedingungen aufweisen. Während früher Infektionsstadien, die die Filamentbildung auf Aktivkohle-haltigen Medien und der Pflanzenoberfläche, die Differenzierung von Appressorien sowie die Penetration der Pflanze einschließen, konnten mikroskopisch keine Defekte in SG200 $\Delta$ *stp1* Infektionen im Vergleich zu SG200 Infektionen detektiert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass SG200 $\Delta$ *stp1* Hyphen meist direkt nach der Penetration der Pflanzenepidermis arretieren. Nur selten konnten Hyphen mehrere Epidermiszellen durchwachsen, zeigten jedoch nie die für SG200 Hyphen typischen Verzweigungen und Schnallen (vgl. Kapitel 2.3).

Das Fehlen eines Phänotyps von SG200 $\Delta$ *stp1* Mutanten bei Wachstum in axenischen Kulturen könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine Expression von *stp1* nur während der

biotrophen Wachstumsphase gezeigt werden konnte. In axenischer Kultur konnte dagegen kein *stp1* Transkript nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 2.4).

Sowohl durch Q-PCR als auch mit *stp1* Promotor-*gfp* Fusionen in dem Reporterstamm KS05 konnte nach 18 Stunden, direkt nach Penetration der Epidermis, eine erste Expression von *stp1* beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt arretieren die SG200 $\Delta$ *stp1* Hyphen in der Epidermis. Zwar zeigten die Q-PCR-Analysen eine starke Expression von *stp1* auch noch in späteren biotrophen Stadien, die Analyse des Reporterstammes jedoch deutete darauf hin, dass die *stp1* Expression hauptsächlich auf Hyphen beschränkt ist, die in der Maisepidermis proliferieren. In der Q-PCR konnte nicht zwischen den verschiedenen Pflanzengeweben unterschieden werden. Die Detektion von *stp1* Transkripten in späten Infektionsstadien mittels Q-PCR kam daher möglicherweise durch die anhaltende Proliferation der Hyphen in der Epidermis zustande, durch die sich *U. maydis* auch in späteren Infektionsphasen im Blatt ausbreitet.

In SG200Potef*stp1* Infektionen konnte eine fast vollständige Komplementation des *stp1* Deletionsphänotyps beobachtet werden (vgl. 2.4.3). Da die Aktivitäten des *otef*-Promotors auf die frühen Phasen (bis 3-4 dpi) beschränkt ist (Doehlemann *et al.*, 2009), bedeutet dieses Ergebnis, dass *stp1* primär während dieses Zeitraumes exprimiert werden muss, um komplementieren zu können. Im Gegensatz dazu konnte beispielsweise für die *pep1* Deletionsmutante, die *pep1* unter Kontrolle des *otef*-Promotors exprimiert, gezeigt werden, dass *pep1* während der gesamten biotrophen Entwicklung benötigt wird; d. h. bei Expression unter dem *otef*-Promotor akkumulieren die *U. maydis* Hyphen in den Zellen und können diese nicht mehr verlassen, weil sie für die Zell-Zell-Passage *pep1* benötigen (Doehlemann *et al.*, 2009).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass *stp1* hauptsächlich direkt nach der Penetration in der Maisepidermis benötigt wird und vermutlich während der Proliferation im Mesophyll und der anschließenden Tumorinduktion keine Rolle mehr spielt. Dies deutet darauf hin, dass die Präsenz von Stp1 im frühen Post-Penetrationsstadium essentiell für eine erfolgreiche Etablierung der biotrophen Interaktion mit *Z. mays* ist.

### **3.4 SG200 $\Delta$ *stp1* Mutanten können keine kompatible Interaktion mit *Z. mays* etablieren**

Die mikroskopische Analyse der Pflanzenreaktion nach Infektion mit SG200 $\Delta$ *stp1* im Vergleich zu SG200 Infektionen lieferte genauere Erkenntnisse über den Infektionsverlauf. Der Grund für den apathogenen Phänotyp von *stp1* Deletionsmutanten ist eine im Vergleich

zu SG200 Infektionen verstärkte Abwehrreaktion, die zum Arrest der Pilzhyphen direkt nach der Penetration der Pflanzenepidermis führt (vgl. Kapitel 2.3).

Bereits direkt nach Penetration der *stp1* Deletionsmutante, also zeitgleich zur Initiation der *stp1* Expression in Wildtypstämmen, war die Induktion erster Abwehrreaktionen der Pflanze zu beobachten. An Penetrationsstellen bildeten sich nach 24 Stunden Papillen. Dies ging mit einer starken Autofluoreszenz in diesen Bereichen einher. Beides kann in SG200 Infektionen nicht bzw. im Bezug auf die Autofluoreszenz nicht in diesem Maße detektiert werden (vgl. 2.4). Es handelt sich vielmehr um typische Mechanismen einer primären Abwehrreaktion seitens der Pflanze, wie sie meist in Nichtwirtsresistenzen beobachtet werden (Maor und Shirasu, 2005; Hückelhoven, 2007). Beispielsweise führt die Infektion der Nicht-Wirtspflanze *Arabidopsis thaliana* mit dem Echten Mehltau *Blumeria graminis* zu ähnlichen Symptomen, die letztendlich eine Infektion verhindern (Maor und Shirasu, 2005). Häufig ist die Papillenbildung auf Calloseeinlagerungen zwischen der Zellwand und der Cytoplasmamembran zurückzuführen (Kudlicka und Brown, 1997). Die in SG200 $\Delta$ *stp1* Infektionen gebildeten Zellwandappositionen ließen sich jedoch nicht eindeutig mit Anilin Blau anfärben. In Callose-defizienten *A. thaliana* Mutanten, die mit *B. graminis* infiziert wurden, konnte sogar eine verstärkte Papillenbildung nachgewiesen werden, die mit einer erhöhten Resistenz einherging (Maor und Shirasu, 2005). Callose ist folglich nicht zwingend Bestandteil von Pathogen-induzierten Papillen. Nach Infektion mit SG200 $\Delta$ *stp1* wurde also wahrscheinlich anderes Material abgelagert. Es könnte sich beispielsweise um Lignin handeln (Chen and Schopfer, 1999), das durch Anfärbung mit fuchsinschwefeliger Säure (Schiff'schem Reagenz) nachgewiesen werden könnte.

Die Pflanzenzellwand konnte in Infektionen mit SG200 $\Delta$ *stp1* trotz der gebildeten Papillen penetriert werden. Nach der Penetration konnten weitere Pflanzenabwehrreaktionen detektiert werden. 24 Stunden nach Infektion konnten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Akkumulationen an der Penetrationsstelle angefärbt werden (vgl. 2.4.2). Die Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Peroxidasen sowie phenolischen Substanzen gehen meist einer hypersensitiven Pflanzenreaktion voraus, bei der es zum kontrollierten Absterben der attackierten Pflanzenzellen kommt (Von Röpenack *et al.* 1998; Hückelhoven *et al.* 1999). Das Absterben der Pflanzenzellen konnte auch nach Infektionen mit der *stp1* Deletionsmutante gezeigt werden: Durch FM4-64 Färbung konnte die für apoptotische Zellen typische Bildung multipler Vesikel nachgewiesen werden. Auch die verstärkte Zugänglichkeit der Pflanzenzellen, die von SG200 $\Delta$ *stp1* penetriert worden waren, für PPI deutet auf ein Absterben infizierter Pflanzenzellen hin. Dieses läßt die Schlussfolgerung zu, dass bei Infektionen mit SG200 $\Delta$ *stp1* eine hypersensitive Antwort

ausgelöst wird, die zu einem lokalen Absterben infizierter Zellen führt. Das makroskopisch erkennbare Kollabieren infizierten Pflanzengewebes kann ebenfalls durch eine hypersensitive Reaktion der Zellen erklärt werden. Da davon meist nur Epidermiszellen betroffen waren, kam es nur selten zu größeren nekrotischen Läsionen. Im Gegensatz dazu zeigen *U. maydis* Mutanten wie die *pit2* Deletionsmutante, die weiter in das Blattgewebe vordringen können und erst im Mesophyll eine Abwehrreaktion auslösen, makroskopisch auffälligere Nekrosen (M. Fleckenstein und G. Doehlemann, pers. Mitteilung).

Um einen genaueren Einblick in die durch SG200 $\Delta$ *stp1* Infektionen ausgelöste Abwehrreaktion zu bekommen, wurden Mais-Transkriptomanalysen früher Infektionsphasen durchgeführt (vgl. 2.4.4). In SG200 Infektionen werden nach zwölf Stunden frühe Abwehrreaktionen induziert, die einer PAMP-vermittelten Abwehrreaktion gleichen (Doehlemann *et al.*, 2008b). In Maispflanzen, die mit SG200 $\Delta$ *stp1* infiziert worden waren konnten zu diesem Zeitpunkt nur geringfügige Differenzen zu SG200 Infektionen detektiert werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass zwölf Stunden nach Infektion noch keine Penetration des Pflanzengewebes stattgefunden und sich die beiden Stämme daher zu diesem Zeitpunkt noch identisch verhalten.

Der Stamm SG200 vermag die frühen Abwehrreaktionen der Pflanze erfolgreich zu supprimieren und kann so die biotrophe Interaktion etablieren. Dies wird 24 Stunden nach Infektion durch eine Repression von 37 der nach zwölf Stunden induzierten Abwehr-assoziierten Transkripte nach 24 Stunden deutlich (Doehlemann *et al.*, 2009). In Abwesenheit von *stp1* hingegen konnte nur eine Repression von 13 dieser Gene beobachtet werden. 24 Abwehr-assoziierte Transkripte waren nach 24 Stunden immer noch induziert und 12 davon zählten sogar zu den 15 am stärksten von SG200 $\Delta$ *stp1* induzierten Genen (5,5 bis 12,5-fach) im Vergleich von SG200 (Tabelle 3). Dies deutet darauf hin, dass die *stp1* Deletionsmutante in Maisinfektionen nicht alle frühen, PAMP-induzierten Abwehrreaktionen supprimieren kann. Die besonders stark induzierten Gene waren PR-Gene, deren Produkte teilweise antifungale Wirkung besitzen (z. B. Endochitinase Zm.16805.8.S1; Osmotin Zm.281.1.S1<sub>at</sub>). Die Induktion von PR-Genen stellt eine typische Begleiterscheinung von inkompatiblen Reaktion dar (Hückelhoven, 2007). Infektionen mit der *stp1* Deletionsmutante gingen zudem nicht wie SG200 Infektionen mit einer Induktion des Jasmonat-Signalweges einher, welche ein Merkmal einer erfolgreichen biotrophen Interaktion darstellt (Glazebrook, 2005). Passend dazu konnte keine Induktion von Genen für Proteaseinhibitoren (z. B. Zm.16580.1.A1<sub>at</sub> und Zm.9034.1.A1<sub>at</sub>: Bowman-Birk Trypsin Inhibitoren; Zm.15278.1.S1<sub>at</sub>: Subtilisin-Chymotrypsin Inhibitor; Zm.81131.1.S1<sub>at</sub>: Cystatin), die in

kompatiblen Systemen durch den Jasmonat-Signalweg induziert werden (Koiwa *et al.*, 1997; Rakwal *et al.*, 2001), beobachtet werden.

Infektionen mit *pep1* Deletionsmutanten induzierten nach 24 Stunden in Mais-Microarrayanalysen ein sehr ähnliches Transkriptommuster wie Infektionen mit SG200 $\Delta$ stp1: Auch hier konnte keine Suppression der primären Abwehrreaktion beobachtet werden und es kam zu keiner Induktion des Jasmonatbiosyntheseweges. Zudem ähnelt der SG200 $\Delta$ pep1 Phänotyp dem einer SG200 $\Delta$ stp1 Infektion: Zwar arretiert die *pep1* Deletionsmutante bereits während der Penetration der Mais-Cytoplasmamembran, jedoch konnte mikroskopisch ebenfalls Papillenbildung sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Akkumulationen an Orten, an denen Penetrationsversuche stattfinden, visualisiert werden (Doehlemann *et al.*, 2009). Im Hinblick auf die Frage nach der Funktion von Stp1 war es daher besonders interessant, Maisgene herauszufiltern, die nach Infektion mit *stp1* bzw. *pep1* Mutanten unterschiedlich reguliert werden. Dies könnte zur Identifizierung von Kandidatengen führen, die in die Erkennung des jeweiligen Effektors involviert sind oder auf die Funktion des jeweiligen Effektors hindeuten. In einem solchen Vergleich der Microarray-Datensets wurden 36 Gene identifiziert, die 24 Stunden nach Infektionen mit SG200 $\Delta$ stp1, jedoch nicht in Infektionen mit SG200 $\Delta$ pep1 im Vergleich zu SG200 Infektionen differenziell reguliert waren (Tabelle 4). Besonders interessant erscheint dabei das höchstinduzierte Gen nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 im Vergleich zu SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen: ein Homolog der Serk3/Bak1-Rezeptor-ähnlichen Kinase aus *A. thaliana* (Zm.10830.1.S1\_at). Diese Rezeptorkinase spielt eine wichtige Rolle bei der Perzeption von konservierten Pathogenstrukturen. Die Kinase bindet beispielsweise nach flg22-Elicitorbehandlung den PRR-Flagellin-Rezeptor Fls2 und leitet das Signal über MAP-Kinase-Kaskaden in das Zellinnere weiter. Dort werden PAMP-vermittelte Resistenzmechanismen ausgelöst, die die Ausbreitung des Pathogens verhindern. Auf diese Weise verbindet die Serk3/Bak1-Rezeptorkinase die Signaltransduktion mit der Perzeption diverser PAMPs (Heese *et al.*, 2007). *bak1* Mutanten zeigen deshalb eine stark verringerte Entwicklung von ROS nach Behandlung mit PAMPs (Heese *et al.*, 2007). Bei dem *Z. mays* Bak1-Homolog könnte es sich um einen Rezeptor handeln, der *U. maydis*-induzierte PAMP-Signale in das Zellinnere weiterleitet. In Anwesenheit von Stp1 wird die Expression des Rezeptors möglicherweise reprimiert und die Perzeption von PAMPs unterbleibt. Da es sich um eine transkriptionelle Regulation des Rezeptors handelt, müsste Stp1 direkt auf die Genregulation von infizierten Maiszellen Einfluß nehmen oder diese über Signaltransduktionswege bzw. Interaktionspartner steuern.

Ein weiteres Gen von besonderem Interesse, das in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen, nicht aber in SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen im Vergleich zu SG200 Infektionen induziert wird, ist ein Protein mit Ähnlichkeit zum NB-LRR Resistenzproteins Rb1-12 (Zm.4202.1.A1\_at). In der Kartoffelvarietät *Solanum dimissum* vermittelt ein Ortholog dieses Proteins Resistenz gegen *P. infestans* Stämme mit entsprechendem Avr-Protein (Kuang *et al.*, 2005). Auch dieses Protein könnte eine Rolle bei der Perzeption von *U. maydis* spielen. In Abwesenheit von *stp1* wird das entsprechende Gen jedoch induziert und könnte zur Erkennung von *U. maydis* beitragen. Auch in diesem Fall müsste Stp1 dazu direkt oder indirekt auf die Genregulation infizierter Maiszellen wirken.

Um die Bedeutung der Serk3/Bak1 bzw. Rp1-12 Maishomologe während der Infektion mit *U. maydis* zu testen, müssten stabile Maislinien generiert werden, in denen die entsprechenden Gene durch RNAi „gesilenced“ sind. Durch Infektion solcher Maislinien mit der *stp1* Deletionsmutante könnte geprüft werden, ob durch das Fehlen dieser Rezeptoren wieder eine kompatible Interaktion ermöglicht wird. Zwar können stabile Maismutanten hergestellt werden (Gordon-Kamm *et al.*, 1990). Aufgrund der langen Generationszeit ist dies jedoch auch mit den neuesten Transformationsmethoden noch immer aufwendig und nimmt etwa neun bis zwölf Monate in Anspruch. Daher wäre es hilfreich, zuvor weitere Hinweise auf eine Beteiligung der Kandidatenproteine an der Erkennung der *stp1* Deletionsmutante zu gewinnen. Dies könnte z. B. durch Virus-induziertes Gensilencing (VIGS) geschehen (Holzberg *et al.*, 2002). Diese Methode wird zurzeit für Mais etabliert und ermöglicht es, Gene systemisch in der Pflanze zu „silencen“ (K. van der Linde und G. Doehlemann, pers. Mitteilung).

Ein weiteres interessantes pflanzliches Gen, das nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 induziert wird, weist Ähnlichkeit zum FIERG1-Protein aus *O. sativa* auf (Zm.2005.1.A1\_at). In Reis wird das *fieryl* Gen, das für einen Plasmamembran-Rezeptor kodiert, durch Behandlung mit Pilzelicitoren induziert und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Signaltransduktion im Zuge der Abwehrreaktion (Kim *et al.*, 2003) Das entsprechende Transkript wurde allerdings sowohl in SG200 $\Delta$ stp1 als auch SG200 $\Delta$ pep1 Infektionen (Doehlemann *et al.*, 2009) induziert. Dies zeigt, dass nur eine Untergruppe Pathogen-assoziiierter Rezeptoren spezifisch in *stp1* Deletionsstämmen induziert wurde. Die Fokussierung auf die Unterschiede zwischen den Reaktionen auf die unterschiedliche *U. maydis* Effektormutanten läßt in Zukunft Einsichten in die Rolle sekretierter Effektoren erwarten.

### 3.5 Die N- und C-Termini von Stp1 sind essentiell für die Proteinfunktion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Domänenstruktur von Stp1 ergaben, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus (As 1-136 und As 339-515) essentiell für die Funktion des Proteins während des biotrophen Wachstums sind. Dahingegen konnte die Glycin-reiche zentrale Region von Stp1 (As 136-339) deletiert werden, ohne dass die Funktion des Proteins beeinträchtigt wird (vgl. 2.8). Dies ist bemerkenswert, da der deletierte Bereich etwa 40% der Gesamtproteinlänge ausmacht. Für den *U. maydis* Effektor Pep1 wurde eine ähnliche Beobachtung gemacht: Hier konnte eine C-terminale Glycin-reiche Region deletiert werden, die etwa 20% der Gesamtproteinlänge entsprach, ohne dass die Funktion des Proteins beeinträchtigt wurde (Doehlemann *et al.*, 2009). Die funktionell wichtigen N- und C-terminalen Bereiche von *U. maydis* Stp1 sind in den orthologen Proteinen SrStp1 und UhStp1 stark konserviert, die Glycin-reiche Region ist hingegen sehr variabel. Sekretierte Effektoren von *U. maydis* und anderen Pflanzenpathogenen unterliegen aufgrund des hohen Selektionsdrucks, ausgelöst durch die fortwährende gegenseitige Anpassung von Pflanzenabwehr und Pathogen-Virulenzfaktoren (Maor und Shirasu, 2005), meist einer hohen Mutationsrate (Dodds *et al.*, 2006; J. Schirawski und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Um die Proteinfunktion zu konservieren, die im Fall von Stp1 im N- und C-terminalen Bereich lokalisiert, müssen jedoch funktionelle Aminosäurereste erhalten bleiben. Da die Funktion von Stp1 für die Etablierung der Biotrophie essentiell ist, könnte dies die geringe Variation der funktionellen N- und C-Termini begründen. Die Deletion der Glycin-reichen Region führt zu einer Reduktion der Proteinsequenz auf die essentiellen Bereiche. Möglicherweise würden diese Bereiche im Laufe der Coevolution mit dem Wirt Mais innerhalb kurzer Zeit Ziele von R-Proteinen. Die Glycin-reiche Region könnte eine Art Schutzsequenz darstellen, die die eigentlich funktionellen Regionen gegenüber der Wirtsabwehr abschirmt und deren Erkennung durch fortwährende Variation entgeht.

Um herauszufinden, warum die Deletion der N- bzw. C-terminalen Bereiche von Stp1 zu einem Funktionsverlust führen, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zunächst sollten die mutagenisierten *stp1* Allele an die *mcherryHA* Sequenz fusioniert werden und in den Stamm SG200 eingebracht werden. Mit solchen Stämmen könnte mikroskopisch festgestellt werden, ob die verschiedenen Moleküle wie die Wildtypform in den Apoplasten sekretiert werden oder in der sekretorischen Maschinerie von *U. maydis* verbleiben. Dies würde ebenfalls einen Funktionsverlust erklären. Außerdem müsste die effiziente Expression durch mikroskopische Analysen der fluoreszenten Fusionsproteine im Zeitverlauf der Infektion, sowie durch Immunpräzipitationen mit HA-spezifischen Antikörpern überprüft

werden. Eine ineffiziente Synthese der Stp1-Derivate bzw. eine hohe Instabilität der Moleküle könnte ebenfalls zum Funktionsverlust führen.

Eine strukturelle oder funktionelle Rolle der zwei Cysteinreste C<sup>125</sup> und C<sup>460</sup> kann ausgeschlossen werden, da das Protein Stp1C<sup>125,460</sup>A den Verlust von Stp1 kompensieren konnte (vgl. 2.8). Die Bildung einer stabilisierenden Cysteinbrücke, wie für apoplastische Proteine häufig beobachtet (Basse *et al.*, 2002; van Esse *et al.*, 2006; Doehlemann *et al.*, 2009), spielt für die Funktion von Stp1 keine Rolle.

Bei der *A. tumefaciens*-vermittelten transienten Expression von Stp1ΔN-Derivaten in *N. benthamiana* konnte für die getesteten Domänen ein unterschiedliches Lokalisierungsverhalten beobachtet werden (Kapitel 2.10). Die Lokalisation im Nukleus konnte dabei auf den C-terminalen Bereich (As 390-515) zurückgeführt werden. Sollte Stp1 *in vivo* in die Pflanzenzelle transloziert werden, so wäre dieser Bereich wahrscheinlich für einen Import in den Nukleus verantwortlich. Eine klassische basische Kernlokalisierungssequenz (NLS) konnte in der Aminosäuresequenz von Stp1 nicht identifiziert werden. Zudem konnte auch keine Interaktion von Stp1ΔN mit Karyopherin-α aus *Arabidopsis thaliana*, das durch Erkennung klassischer NLS den Import von vielen nukleären Proteinen in den Kern vermittelt, im Hefe-Zwei-Hybrid-System detektiert werden (nicht gezeigt). Da NLS jedoch nicht immer bioinformatisch vorhersagbar sind (Sorokin *et al.*, 2007), läßt sich nicht ausschließen, dass im C-terminalen Bereich von Stp1 dennoch eine derartige Sequenz vorhanden ist. Er wäre auch möglich, dass Stp1ΔN über unkonventionelle Importmechanismen, z. B. über Interaktion mit einem alternativen Importin, oder nach Bindung importierter Interaktionspartner in den Nukleus gelangt (Sorokin *et al.*, 2007).

Für Stp1 konnte eine Interaktion mit fünf intrazellulären Pflanzenproteinen gezeigt werden (vgl. 2.10 und 3.8). Der Interaktionsbereich von Stp1 mit Sip12 und Sip29 konnte durch Coexpression der Interaktoren mit mutagenisierten und trunkierten *stp1* Allelen im Hefe-Zwei-Hybrid-System eingegrenzt werden. Für die Interaktion mit Sip12 und Sip29 waren Bereiche zwischen As 199-279 bzw. 279-339 in Stp1 essentiell; der Glycin-reiche Bereich allein konnte jedoch keine Interaktion vermitteln. Da das Protein Stp1Δ136-339, in dem die Glycin-reiche Region nicht vorhanden ist, funktionell ist, sollte dieses Protein im Bezug auf die Interaktion mit Sip12 und Sip29 im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet werden. Wenn die zwei Proteine tatsächlich *in vivo* relevante Interaktoren von Stp1 darstellen, sollten sie mit Stp1Δ136-339 interagieren.



### 3.6 Pilzhyphe sekretieren Stp1 als N-glykosyliertes Protein

Die bioinformatisch vorhergesagte Sekretion von Stp1 konnte nach konstitutiver Sekretion in axenischer Kultur verifiziert werden. Dabei traten jedoch Unterschiede bei der Stp1 Sekretion von Sporidien und artifiziell induzierten Filamenten des Stammes AB33 auf (vgl. Kapitel 2.7). In Sporidien konnten bei konstitutiver Expression von *stp1* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors lediglich Proteinfragmente, nicht aber das Vollängenprotein im Kulturüberstand detektiert werden. Die Bildung dieser Fragmente konnte auf die Anwesenheit der Endopeptidase Kex2 zurückgeführt werden. In dem *kex2* Deletionsstamm SG200 $\Delta$ *kex2*-Potefstp1 konnte Stp1 in voller Länge im Überstand nachgewiesen werden. Die Relevanz der Kex2-abhängigen Prozessierung von Stp1 für das biotrophe Wachstum von *U. maydis* konnte allerdings nicht in Pflanzeninfektionen überprüft werden, da *kex2* Deletionsmutanten pathogener Pilze einen pleiotrophen Phänotyp zeigen (Venancio *et al.*, 2002). So ist auch in *U. maydis* der *kex2* Deletionsstamm apathogen (N. Rössel, O. Müller und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

Die Stp1 Aminosäuresequenz enthält drei konventionelle dibasische Kex2-Schnittstellen (R<sup>41</sup>R<sup>42</sup>; R<sup>371</sup>R<sup>372</sup> und K<sup>390</sup>R<sup>391</sup>; Brenner und Fuller, 1992). Aminosäuresubstitutionen in diesen Schnittstellen resultierten jedoch nicht in der Sekretion von Vollängen-Stp1 in Sporidien, wie es in den *kex2* Deletionsstämmen beobachtet worden war. Zwar waren die Proteinfragmente größer, was darauf hinweist, dass mindestens eine Schnittstelle eliminiert worden war, jedoch wurden immer noch verkürzte Proteinfragmente im Überstand detektiert. Für diese Beobachtung gibt es zwei Erklärungen. Zum einen enthält Stp1 vier weitere putative Kex2-Schnittstellen K<sup>80</sup>K<sup>81</sup>, P<sup>107</sup>R<sup>108</sup>, T<sup>144</sup>R<sup>145</sup> und K<sup>432</sup>K<sup>433</sup>, von denen allerdings nur das zweitgenannte in SrStp1 und UhStp1 konserviert ist. Bei diesen Motiven handelt es sich jedoch um sehr unkonventionelle Erkennungssequenzen, so dass die Spaltung hier eher unwahrscheinlich ist (Bevan *et al.*, 1998; Rockwell *et al.*, 2002; Brenner und Fuller, 1992). Die zweite Möglichkeit wäre, dass die Stp1 Fragmente nicht direkt durch die Aktivität der Kex2 Protease entstehen. Da Kex2 an der Aktivierung diverser Enzyme beteiligt ist, könnte es sich auch um einen sekundären Effekt handeln (Bader, 2008). Durch die Deletion von *kex2* wurde eine Aktivierung anderer Proteasen eventuell verhindert. In zukünftigen Arbeiten sollten die vier unkonventionellen Schnittstellen in der Stp1 Sequenz ebenfalls eliminiert werden und geprüft werden, ob dann Vollängenprotein sekretiert wird. Interessanterweise trat die bei Sekretion durch Sporidien beobachtete Kex2-abhängige Spaltung von Stp1 in AB33 Filamenten nicht auf. Hier konnte eine Sekretion des Vollängenproteins nachgewiesen werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass Vollängen-Stp1 auch während des biotrophen

Wachstums sekretiert wird. In der Tat konnte durch Immunpräzipitationen die Sekretion des Volllängenproteins auch in Pflanzenmaterial, das mit dem Stamm SG200stp1-HA infiziert worden war, gezeigt werden. Dies unterstreicht, dass die Kex2-abhängige Prozessierung wie vermutet keine physiologische Relevanz hat. Das unterschiedliche Sekretionsverhalten von Stp1 in Sporidien und AB33 Hyphen könnte durch eine differenzielle Expression der Kex2-Protease oder einer sekundär agierenden Kex2-aktivierten Protease erklärt werden. Transkriptomdaten weisen allerdings auf eine konstitutive Expression von *kex2* während der saprophytischen und biotrophen Wachstumsphase hin (Vraneš, 2007), so dass entweder die zweite Möglichkeit zutrifft oder die Kontrolle der Aktivität post-translational erfolgt. Die in *stp1* Überexpressionsstämmen unter der Kontrolle von *P<sub>otef</sub>* auftretenden Proteinfragmente können wahrscheinlich durch Sekretionsstress erklärt werden. Dieser führt durch eine Überlastung der sekretorischen Maschinerie (ER-Stress) zur vermehrten Degradation sekretierter Proteine („unfolded protein response“; Sidrauski *et al.*, 1998).

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse deuten an, dass die Sekretion von Stp1 möglicherweise einer genauen Kontrolle unterliegt, die mit der essentiellen Rolle des Effektors für die biotrophe Wachstumsphase zusammenhängen könnte. Vorwiegend in apikalen oder polarisierten Säugerzellen, aber auch in *S. cerevisiae* und Pilzen wird zwischen konstitutiver und regulierter Sekretion unterschieden (Martin, 1997; Glombik und Gerdes, 2000). Sekretion kann auf unterschiedlichen Ebenen kontrolliert werden. Die Regulation kann beispielsweise über die Spezifität von Cargo-Rezeptoren auf der Ebene des Cargo-Sorting am Übergang vom ER zum Golgi erfolgen (Springer *et al.*, 2000). Die Fusion von beladenen exocytotischen Vesikeln mit der Plasmamembran vermitteln t- und v-SNARE-Proteine, deren Komplexbildung ebenfalls reguliert werden kann. In Neuronen beispielsweise wird der Rezeptor Synaptogamin durch Calcium-Stimuli aktiviert, woraufhin sich ein funktioneller t-v-SNARE-Komplex bildet (Robinson und Martin, 1998). Neben neuronalen können auch hormonale Stimuli in Säugerzellen die regulierte Sekretion auslösen (Martin, 1997; Glombik und Gerdes, 2000; Douglas, 1968). Auch individuelle Sorting-Signale werden für einige Proteine beschrieben (Glombik und Gerdes, 2000). Interessanterweise wurde für die regulierte Sekretion einiger Proteine, wie Prorenin oder Prosomatostatin, eine Abhängigkeit von bislang noch unbekanntem Endopeptidasen beobachtet (Brechler *et al.*, 1996). Möglicherweise existiert ein ähnlicher Mechanismus auch in *U. maydis*, und die effiziente und dosierte Sekretion von Effektoren wird nicht allein transkriptionell, sondern zusätzlich durch bislang unbekannte Mechanismen oder Stimuli kontrolliert. Dadurch könnte sichergestellt werden,

dass der Effektor zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort in die Pilz/Pflanze-Interaktionszone abgegeben wird.

Für sekretiertes Stp1 konnte eine N-Glykosylierung beobachtet werden (vgl. 2.7.4). Dies traf nicht nur für Protein zu, das aus Kulturüberständen in axenischer Kultur gewonnen wurde, sondern auch für Stp1-HA, das mittels Immunpräzipitation aus infiziertem Pflanzengewebe angereichert wurde. Die Mehrheit eukaryotischer Proteine wird im ER durch N-Glykosylierung post-translational modifiziert (Welpi *et al.*, 1983). Die Modifikation ist vor allem für die korrekte Faltung, Oligomerisierung, Qualitätskontrolle und Stabilität des Proteins wichtig (Helenius und Aebi, 2001). Dabei kommt es zunächst im ER Lumen zu einer inkompletten Glykosylierung. Das vollständig gefaltete, glykosylierte Proteine wird dann ins Golgi-Kompartiment weitertransportiert, wo während des Reifungsprozesses die Zuckerreste meist weiter modifiziert werden (Helenius und Aebi, 2001). Bei den zwei beobachteten unterschiedlichen Spezies von Stp1 könnte es sich daher um ER und Golgi-assoziierten Formen handeln. Um herauszufinden, ob die Glykosylierung von Stp1 essentiell für die Proteinfunktion ist, müssten die entsprechenden Glykosylierungsstellen ausgetauscht werden. Das entsprechende *stp1* Allel müsste im SG200 $\Delta$ *stp1* Hintergrund exprimiert werden, um die Funktion anhand der Komplementation des Phänotyps zu überprüfen. Bioinformatische Programme sagen für die Aminosäuresequenz von Stp1 drei mögliche N-Glykosylierungsstellen an den Positionen N<sup>29</sup>, N<sup>34</sup> und N<sup>506</sup> voraus (NetNGlyc 1.0; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Um zu testen, ob diese Aminosäurereste wirklich die Orte der N-Glykosylierung darstellen, sollten diese durch Glutaminreste ersetzt werden. Zudem müssten auch Kulturüberstände von AB33 Hyphen, die Stp1N<sup>29,34,506</sup>Q exprimieren, analysiert werden. In diesen sollte keine N-Glykosylierung von Stp1 mehr feststellbar sein. Sollte die Glykosylierung wichtig für die Funktion von Stp1 sein, wäre rekombinant in *E. coli* hergestelltes Protein möglicherweise nicht funktionell. Bei dem translozierten Effektor Rtp1 aus *U. fabae* konnte ebenfalls eine N-Glykosylierung nachgewiesen werden. Jedoch ist auch hier nicht bekannt, ob diese eine Rolle für die Funktion spielt (Kemen *et al.*, 2005).

### 3.7 Während der biotrophen Phase wird Stp1 in die apoplastische Interaktionszone sekretiert

Die Sekretion von Vollängen-Stp1 durch *U. maydis* Hyphen konnte sowohl in axenischer Kultur als auch *in planta* gezeigt werden. Jedoch war die eigentlich interessante Frage, wo Stp1 in Pflanzeninfektionen nach der Sekretion lokalisiert. Zunächst werden sekretierte Proteine in den Interaktionsraum zwischen Pilzhyphe und der pflanzlichen

Cytoplasmamembran abgegeben. Danach besteht die Möglichkeit, dass der Effektor im Apoplasten agiert und dort löslich vorliegt oder an die Cytoplasmamembran der Pflanze oder die Zellwand des Pilzes bindet. Außerdem könnten Effektoren, wie beispielsweise für die Pilzproteine Rtp1 aus *U. fabae* oder AvrM, AvrL657, AvrP123 und AvrP4 aus *M. lini* gezeigt (Kemen *et al.*, 2005; Catanzariti *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2006), in die Pflanzenzelle transloziert werden und dort ihre Funktion ausüben.

Die Frage nach der Lokalisierung von Stp1 wurde zunächst durch die Lokalisierung von fluoreszierenden Stp1-Fusionsproteinen beantwortet (vgl. Kapitel 2.9). Für Stp1-GFP- sowie Stp1-RFP-Fusionsproteine konnten Hyphen-ummandelnde Signale detektiert werden. Mittels immunocytochemischer Detektion durch HA-Antikörper konnte Stp1-HA vergleichbar lokalisiert werden. Alle Stp1-Fusionsproteine wurden vorwiegend an den Hyphenspitzen detektiert, wo Sekretion erfolgt (Bauer und Oberwinkler, 1995). Ähnliches wurde bereits für verschiedene andere sekretierte Pilzproteine, wie beispielsweise eine Glucoamylase aus *A. niger* oder Pep1 aus *U. maydis*, beobachtet und reflektiert die Sekretionsmaschinerie in den Pilzhypen (Gordon *et al.*, 2000; Doehleemann *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2008). Interessanterweise wies sekretiertes Stp1, das die Pilzhyphe ummantelte, keine gleichmäßige, sondern eine stark fleckige Verteilung auf. Dies kann momentan nicht erklärt werden und könnte verschiedenste Gründe haben. Zum Einen könnte das Muster durch die Exozytose entstehen, bei der lokal größere oder kleinere Proteinmengen in die Interaktionszone abgegeben werden und Diffusion aufgrund der besonderen Beschaffenheit der apoplastischen Interaktionszone verhindert wird. Die Interaktionszone wurde bislang für das *U. maydis/Z. mays* Pathosystem nicht detailliert analysiert. Möglicherweise werden auch größere Proteinkomplexe gebildet, die das jeweilige Stp1-Fusionsprotein enthalten.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass etwa fünf Tage nach Infektion die Fusionsproteine Stp1-GFP bzw. Stp1-RFP verstärkt in Kompartimenten innerhalb der Pilzhyphe akkumulierten. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um Vakuolen. Allerdings müsste eine Colokalisierung mit einem vakuolären Markerprotein, wie der Carboxypeptidase Y (Prescianotto-Baschong und Riezman, 2002), erfolgen, um dies zu beweisen. Es erscheint zunächst ungewöhnlich, dass ein sekretiertes Protein plötzlich in den Degradationsweg umgeleitet und in Vakuolen abgebaut wird. Jedoch wurde dies bereits in anderen Pilzen gezeigt. Das Membranprotein Gap1P, eine Aminosäure Permease, lokalisiert bei Wachstum auf Ammonium- oder Harnstoff-haltigem Medium als einziger Stickstoffquelle in der Plasmamembran. Bei Wachstum auf Glutamat-Medium jedoch wird das Protein von COPII-Vesikeln des Golgi-Apparates in die Vakuolen-Abbauweg umgelenkt (Roberg *et al.*, 1997).

Ein ähnlicher Mechanismus der post-translationalen Regulation, möglicherweise sogar durch einen Pflanzenstimulus ausgelöst, wäre auch für das Targeting von Stp1 während der Sekretion denkbar und könnte neben den in Kapitel 3.5 diskutierten Regulationsmechanismen eine weitere Ebene der Sekretionskontrolle darstellen.

Auch wenn die Sekretion von Stp1 durch die Lokalisierung um die Pilzhyphe eindeutig verifiziert werden konnte, konnte aus den durchgeführten Experimente nicht geschlossen werden, wo genau sich das Protein nach der Sekretion befindet und ob es eventuell in die Pflanzenzelle transloziert wird. Die Auflösung der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie reichte nicht aus, um zwischen einer Lokalisierung in der pilzlichen Zellwand, im Apoplasten oder der pflanzlichen Cytoplasmamembran zu unterscheiden. Problematisch war zudem, dass die Fluoreszenzsignale mit den pflanzlichen Hintergrundsignalen interferierten und schwache Signale, wie sie nach einem Import in die Pflanzenzelle zu erwarten wären, nicht wahrnehmbar gewesen wären. Mit Hilfe einer mCherryHA-Fusion konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Stp1-Fusionsprotein nach der Induktion von Plasmolyse in den erweiterten apoplastischen Räumen gleichmäßig ausbreitet. Dies konnte auch für das Effektorprotein Pep1 gezeigt werden (Doehlemann *et al.*, 2009). Für das sekretierte Virulenz-attenuierende *U. maydis* Protein Vcp1-mCherryHA konnte hingegen nach Induktion von Plasmolyse keine Diffusion in den Apoplasten beobachtet werden. Stattdessen befand sich Vcp1-mCherryHA in der Pilzzellwand (A. Djamei, persönl. Mitteilung). Dies zeigt, dass die Induktion von Plasmolyse eine geeignete Methode darstellt, um Proteine in der Pilz-Pflanze-Interaktionszone zu visualisieren. Das Entstehen der sphärischen Einschlüsse, die während der Plasmolyse im Cytoplasma infizierter Zellen auftraten, könnte auf osmotischem Zellstress beruhen und möglicherweise eine Vorstufe von Zelltod sein (nicht dargestellte Beobachtung; Boursiac *et al.*, 2005).

Ein weiteres zentrales Problem war die Frage, ob die für Lokalisierungen verwendete Stp1-Fusionsproteine nach der Sekretion während der biotrophen Phase in voller Länge vorliegen oder gespalten vorliegen. Die Abspaltung von Affinitätstags im Apoplasten wurde beispielsweise im *Cladosporium fulvum*/Tomaten-Pathosystem gezeigt (Van Esse *et al.*, 2006). Bereits bei der Sekretion von Stp1-GFP durch axenisch wachsende Filamente kam es zur Abspaltung von GFP im Kulturüberstand und das Volllängen Fusionsprotein Stp1-GFP war nicht detektierbar. Das Fusionsprotein Stp1-HA konnte in voller Länge aus infizierten Pflanzen isoliert werden. Im Gegensatz dazu konnte jedoch Stp1-mCherryHA nur in geringen Mengen als Volllängen-Protein detektiert werden. Der überwiegende Teil lag als verkürztes mCherryHA-Fragment von etwa 20 kDa vor. Da das native mCherryHA Protein etwa 28 kDa

umfasst, ist es unwahrscheinlich, dass die verkürzte Version noch fluoreszierend ist. Die ebenfalls detektierten größeren C-terminalen Fragmente jedoch können im Mikroskop wahrgenommen werden und somit die Lokalisierung des Volllängen-Proteins überdecken. Es ist derzeit unklar, ob die Degradation von Stp1-mCherryHA auf die Extraktionsmethode zurückzuführen ist oder die *in vivo* Situation widerspiegelt. Möglich wäre auch, dass die verwendeten Fusionsproteine relativ instabil sind und GFP und mCherry aufgrund ihrer hohen Stabilität akkumulieren.

Da die mikroskopische Lokalisierung von Stp1 sich aus den aufgezählten Gründen als sehr schwierig herausstellte, wurde außerdem eine auf dem FLP/FRT-System basierende genetische Methode verwendet, die zukünftig zur Identifikation translozierter Effektoren dienen soll. Obwohl einige Reporterpflanzenlinien getestet wurden, konnte bislang nach Infektionen mit SG200stp1-FLP keine Aktivität der Reportergene *gus* oder *gfp* gezeigt werden. In Zukunft werden diesbezüglich noch weitere Maislinien, die die *FRT*-begrenzten Reporterkonstrukte tragen, getestet werden. Da die entsprechenden Konstrukte ektopisch in das Maisgenom integriert wurden, kann es je nach Insertionsort zu starken Unterschieden der Expressionsstärke durch Positioneffekte kommen (Sanders *et al.*, 1987). Diese konnten auch für die bislang verwendeten Pflanzenlinien gezeigt werden (D. Becker, pers. Mitteilung). Außerdem war bislang für diesen Ansatz keine Positivkontrolle vorhanden. Mittlerweile konnte in Zusammenarbeit mit Dr. A. Djamei (MPI Marburg) für das Oomycetenprotein Avr1b gezeigt werden, dass es, wie von Dou *et al.* (2008) für Tabak und Zwiebel gezeigt, nach transienter Produktion in Maiszellen sekretiert und re-importiert wird. Ein kodon-optimiertes *avr1* Allel wird nun als FLP-Fusion in *U. maydis* exprimiert werden, um es bezüglich der FLP-Aktivität nach Infektionen der Reporterlinien zu testen.

### **3.8 Stp1 interagiert mit intrazellulären Maisproteinen**

In einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurden für Stp1 $\Delta$ N fünf intrazelluläre Maisproteine als Interaktionspartner (Sip) identifiziert (vgl. 2.10). Es ist jedoch unklar, ob die pflanzlichen Interaktionspartner real sind, da kein bislang eindeutiger Beweis für eine Translokation von Stp1 in die Pflanzenzelle geführt werden konnte. Da in dieser Arbeit durch Domänenanalysen gezeigt werden konnte, dass der schwach konservierte, Glycin-reiche Bereich von Stp1 (As 136-339) keine Rolle für die Funktion des Proteins spielt, sollte die Wechselwirkungen mit den im Hefe-Zwei-Hybrid-System ermittelten Interaktionspartnern mit dem Protein Stp1 $\Delta$ 136-339 überprüft werden. So könnten falsch-positive Interaktionspartner, die keine Bedeutung für die Funktion von Stp1 haben, ausgeschlossen werden.

Sip2, eine chloroplastidäre Adenylat-Kinase wurde nicht näher analysiert, da es unwahrscheinlich erschien, dass Stp1 in pflanzliche Chloroplasten importiert wird und dort mit dem ADP Recycling interferiert (Wild *et al.*, 1997).

Sip10 zeigt Homologien zu Myrosinase-Vorläuferproteinen. Myrosinasen sind vorwiegend in *Brassicaceae* an der Abwehr von Herbivoren beteiligt, indem sie Glucosinolate hydrolysieren. Dadurch entstehen Glukose sowie toxische Isothiocyanate. Normalerweise liegen Glucosinolate und Myrosinasen räumlich getrennt vor. Erst bei Zerstörung der Zelle, z. B. durch Insektenfraß, kann das Enzym sein Substrat umsetzen (Luthy und Matile, 1984). Die toxischen Produkte sind dann an der Pathogenabwehr beteiligt. Da Myrosinasen bislang vorwiegend in Kreuzblütlern wichtige Abwehrfunktionen gegen Fressfeinde zugeschrieben wurden, erscheint eine Interaktion von Stp1 mit diesem Enzym zunächst unwahrscheinlich. Zudem lokalisieren Myrosinasen meist in spezialisierten Myrosinzellen, die für Mais nicht beschrieben wurden. Es gibt jedoch auch Berichte über Myrosinasen, die cytoplasmatisch, vakuolär oder Membran-assoziiert vorliegen (Luthy und Matile, 1984). Zudem wurde für Myrosinase-ähnliche Proteine eine Funktion bei der Nicht-Wirtsresistenz gegen Mycorrhiza (Tester *et al.*, 1987; Schreiner und Koide, 1992) und in der PAMP-induzierten Immunabwehr gegen Mikroorganismen gezeigt (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009).

Bei Sip12 handelt es sich wahrscheinlich um eine RING-H2 E3-Ubiquitin-Ligase. Sip12 zeigt das für diese Proteine typische Cystein-Muster. Zudem besitzt das Protein eine Kernlokalisierungssequenz und DNA-Bindemotive. Ubiquitinierung ist eine zentrale Modifikation, die für den Zellzyklus, transkriptionelle Regulation und Hormonsignalwege eine Rolle spielt (Angot *et al.*, 2008). Vor allem bakterielle und virale, aber auch pilzliche Effektoren von Pflanzenpathogene interferieren daher mit dem Ubiquitin Signalweg ihrer Wirte (Übersicht in Angot *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2006). Ein besonders attraktives Ziel sind hierbei E3-Ubiquitin-Ligasen, denn diese vermitteln bei der Ubiquitinierung von Zielproteinen die Spezifität (Angot *et al.*, 2007). Der *P. syringae* Effektor HopM1 supprimiert die Pflanzenabwehr, indem es die Proteasom-abhängige Eliminierung des *A. thaliana* Proteins MIN7 vermittelt. MIN7 ist ein GEF und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellwand-assoziierten Pathogenabwehr (Nomura *et al.*, 2006). Die RING-H2 E3-Ubiquitin-Ligasen ATL2/ATL6 und BRH1 aus *A. thaliana* sind an der Pflanzenantwort nach Behandlung mit dem Elicitor Chitin beteiligt (Salinas-Mondragon *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2004; Molnar *et al.*, 2002).

Auch Sip31, ein unbekanntes Protein, das eine putative DnaJ-Domäne enthält, könnte als Chaperon in Ubiquitinierungsprozesse involviert sein. Die Interaktion von AVR3a aus *P.*

*infestans* und dem R-Protein 3a ist beispielsweise abhängig von dem Ubiquitin-Ligase-assoziierten Protein SGT1 und einem Hsp90-Chaperon (Bos *et al.*, 2006).

Bei dem Interaktionspartner Sip29 könnte es sich um einen transkriptionellen Regulator handeln. Zwar gibt es keine Homologien zu bekannten Proteinen. Bioinformatische Analysen ergaben jedoch die Präsenz von DNA-Bindemotiven sowie einer Methyl-CpG Bindedomäne. Durch die Interaktion mit Sip29 könnte Stp1 möglicherweise Einfluss auf die Genexpression nehmen. Veränderungen im Status der DNA-Methylierung wurden bei Pathogeninfektionen, wie z. B. in der Interaktion von *P. syringae* und *Arabidopsis*, beobachtet (Pavet *et al.*, 2006).

Eine Verifizierung der im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten Interaktionen könnte durch Co-Immunpräzipitation von Stp1-HA und den jeweiligen Interaktionspartnern aus infizierten Pflanzenzellen geschehen. Um schwache Interaktionen nachzuweisen, sollten die Proteine dafür zunächst chemisch quervernetzt werden. Die Etablierung eines solchen Co-Immunpräzipitationsprotokolls war aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht mehr möglich. Alternativ könnte auch rekombinant produziertes Protein an eine Affinitätsmatrix gekoppelt werden und Interaktionspartner durch Inkubation mit Extrakten infizierter Pflanzen isoliert werden. Dies war jedoch aufgrund der Unlöslichkeit bzw. Degradation von Stp1 nach Expression in heterologen Systemen bislang nicht möglich.

### **3.9 Stp1, ein vielversprechender Kandidat für einen translozierten *U. maydis* Effektor?**

Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf einen Transfer von Stp1 in die Pflanzenzelle. Zum einen lokalisiert Stp1 $\Delta$ N-YFP nach transienter Expression in *N. benthamiana* in Subkompartimenten des Nukleus (Kapitel 2.10). Bislang konnte dies für keinen anderen *U. maydis* Effektor beobachtet werden (R. Kahmann, pers. Mitteilung). Es existieren diverse Subkompartimente im Nukleus. Bei den von Stp1 $\Delta$ N-YFP geformten nukleären Subkompartimenten könnte es sich beispielsweise um PML Bodies, Speckles mit angereicherten Splicing-Faktoren oder Cajal Bodies handeln. Jedoch können andere Subkompartimente nicht ausgeschlossen werden und erst die Colokalisierung mit Markerproteinen der einzelnen Kompartimente könnte Aufschluss über die genaue Lokalisierung geben.

Die Aufnahmemechanismen von translozierten Pilzproteinen, wie etwa Rtp1 oder Avr-Pita (Kemen *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2000) sind bislang nicht bekannt. Auch ist nicht klar, ob die Machinerie für den Transfer vom Pilz, der Pflanze oder beiden bereitgestellt wird. Für den translozierten Oomyceteneffektor Avr1 konnte dagegen eine Aufnahme in Pflanzenzellen ohne vorhandenes Pathogen bewiesen werden (Dou *et al.*, 2008). Bei transienter Expression



von Stp1-YFP in *N. benthamiana* konnte nach Sekretion in den Apoplasten kein Re-Import in die Pflanzenzelle beobachtet werden (vgl. 2.10.1). Dies könnte zum einen bedeuten, dass das Protein nicht transferiert wird. Allerdings könnten auch fehlende Komponenten des Pathogens oder fehlende Komponenten der im Vergleich zur monokotylen Wirtspflanze Mais evolutionär weit entfernten dikotylen Tabakzelle für den fehlenden Re-Import verantwortlich sein.

Derzeit wird in Zusammenarbeit mit Dr. A. Djamei eine transiente Methode zur ballistischen Transformation von Maisblättern etabliert. Mit dieser Methode wird es möglich sein, einen Re-Import von Stp1 im Wirtssystem zu testen, sowie die in *N. benthamiana* beobachtete Lokalisation von Stp1 $\Delta$ N in Subkompartimenten des Nukleus zu überprüfen.

Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Transfer von Stp1 in die Pflanzenzelle konnte durch die Identifizierung intrazellulärer Maisproteine als Interaktionspartner von Stp1 im Hefe-Zwei-Hybridsystem sowie die Co-Expression von Stp1 mit den Interaktoren Sip12 und Sip29 in *N. benthamiana* gewonnen werden. Diese zeigen eine vollständige bzw. teilweise Kollokalisierung mit Stp1 $\Delta$ N in nuklearen Subkompartimenten (vgl. Kapitel 2.11). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Ergebnisse auf der artifiziellen Zusammenführung der Proteine beruhen. Da die Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System künstlich im Nukleus zusammengeführt werden, könnte es zu Interaktionen von Proteinen kommen, die in der natürlichen Situation gar nicht im selben Kompartiment vorliegen (vgl. 3.8).

### **3.10 Mögliche Funktionen von Stp1: Suppression von Zelltod?**

Bezüglich der Funktion von Stp1 ist denkbar, dass das Protein bei apoplastischer Lokalisierung als Enzyminhibitor fungiert, wie z. B. für Avr2 aus *C. fulvum* gezeigt (Shabab *et al.*, 2008). Der sehr drastische Deletionsphänotyp könnte aber auch auf eine regulatorische Funktion hinweisen. Diese könnte durch Bindung an Rezeptoren in der Cytoplasmamembran der Pflanze vermittelt werden oder nach Translokation in die Pflanzenzelle durch direkte oder indirekte Beeinflussung der transkriptionellen Regulation von zentralen Pflanzenabwehr-Signalwegen im Nukleus.

Zentrale, in dieser Arbeit gewonnene Ergebnisse weisen auf eine Funktion von Stp1 bei der Suppression von apoptotischem Zelltod infizierter Pflanzenzellen hin. Mikroskopisch konnte nach Infektion mit SG200 $\Delta$ stp1 ein durch die hypersensitive Pflanzenreaktion ausgelöster Apoptose-ähnlicher Zelltod penetrierter Pflanzenzellen nachgewiesen werden. Dieser wird in SG200 Infektionen erfolgreich supprimiert (Doehlemann *et al.*, 2008b). In Mais-

Transkriptomanalysen konnte im Gegensatz zu SG200 Infektionen in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen keine Induktion von Cystatin beobachtet werden. Cystatin ist ein Cystein-Proteaseinhibitor, der an der Inhibierung von Apoptose in Pflanzenzellen im Verlauf einer hypersensitiven Reaktion beteiligt ist (Belenghi *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 1999). Auch in Säugerzellen kann ein Cystatin die durch das Herpes Simplex Virus ausgelöste Apoptose von menschlichen Epithelzellen erfolgreich unterdrücken (Peri *et al.*, 2007). Allerdings konnte für den Zelltodsuppressor Bax-Inhibitor 1 (Zm.12293.1.S1\_at; Eichmann *et al.*, 2004) eine leichte Induktion (2,9-fach) in SG200 $\Delta$ stp1 Infektionen im Vergleich zu SG200 Infektionen detektiert werden. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass Stp1 mit der Cystatin-vermittelten Zelltodsuppression, nicht aber mit dem Bax-induzierten Weg, interferiert. Stp1 war nicht in der Lage, wie beispielsweise für den *P. sojae* Effektor Avr1b gezeigt, in *S. cerevisiae* den Bax-induzierten Zelltod zu inhibieren (vgl. Kapitel 2.12; Dou *et al.*, 2008). Möglicherweise wurde hier jedoch der falsche Zelltodinduktor getestet. Zwar laufen Zelltodinduktionswege auf identische Reaktionen der Zelle hinaus, jedoch könnte Stp1 auf einen spezifischen Signalweg, der zur Induktion dieser Reaktionen führt, Einfluss nehmen. Ähnliches wurde bereits für translozierte bakterielle Effektoren beschrieben (He *et al.*, 2006). AvrPtoB beispielsweise inhibiert wie einige andere *P. syringae* Effektoren die durch Infektion ausgelöste hypersensitive Reaktion in resistenten *A. thaliana* Linien. In *S. cerevisiae* können jedoch nur einige dieser Effektoren den Bax-induzierten Zelltod inhibieren (Jamir *et al.*, 2004). Für AvrPtoB konnte dies nicht gezeigt werden. Dieser Effektor inhibiert stattdessen den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Zelltod (Abramovitch *et al.*, 2003). Der RXLR-Oomyceteneffektor AVR3a inhibiert spezifisch den *P. infestans* Elicitor INF-1-induzierten Zelltodweg in *N. benthamiana* (Bos *et al.*, 2006). Es sollte folglich überprüft werden, ob Stp1 spezifische Zelltodinduktionswege, die beispielsweise durch Behandlung mit NO, Fumonisin B1 oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert werden, inhibieren kann (Abramovitch *et al.*, 2003; Asai *et al.*, 2000).

Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifizierten Interaktoren von Stp1 zeigen möglicherweise ebenfalls einige Verbindungen zu Apoptose-Inhibitionsmechanismen. Durch Ubiquitinierung von pro- und anti-apoptotischen Proteinen ist der Ubiquitin-Signalweg an der Regulation von Apoptose beteiligt (Lee und Peter, 2003). Die RING E3-Ubiquitin-Ligase Sip12 könnte in diesem Signalweg agieren. Auch Sip31 könnte als Chaperon in derartige Ubiquitinierungsprozesse involviert sein. Der bakterielle Effektor AvrPtoB stellt beispielsweise selber eine RING U-Box E3-Ubiquitin Ligase dar, die für Virulenz und Zelltodsuppression von *P. syringae* nach Infektion der Wirtspflanze Tomate essentiell ist (Janjusevic *et al.*, 2006).

### 3.11 Perspektiven

Sekretierte *U. maydis* Effektoren werden zunächst in die apoplastische Interaktionszone zwischen der Pilzhyphe und der Cytoplasmamembran der Pflanzenzelle sekretiert. Die Beantwortung der Frage, ob Stp1 im Apoplasten infizierter Maiszellen verbleibt, oder ob eine Translokation in die Pflanzenzelle stattfindet, wird die zentrale Aufgabe zukünftiger Experimente sein.

Verschiedene Experimente, die eine Translokation von Stp1 oder anderen *U. maydis* Effektoren beweisen könnten, werden zurzeit durchgeführt. Zum einen werden wie in Kapitel 3.7 beschrieben, Maisreporterlinien bezüglich des Transfers von Avr1-FLP untersucht. Falls dies gezeigt werden kann, kann auch eine Aussage über Stp1-FLP getroffen werden. Zum anderen soll durch die in Kapitel 3.8 beschriebene ballistische Transformation von Maisblättern neue Informationen gewonnen werden.

Basierend auf der Hypothese, dass Stp1 in infizierte Maiszellen transloziert werden und dann spezifisch in Subkompartimenten des Nukleus lokalisieren könnte, wird momentan ein Stamm generiert, bei dem das Protein an ein zweifaches nukleares Exportsignal (NES) fusioniert ist (Stp1-2NES-HA-YFP). Wenn Stp1 eine Funktion im Nukleus der Pflanzenzelle ausübt, sollte ein entsprechendes Konstrukt den Stamm SG200 $\Delta$ stp1 nicht komplementieren können. In transient transformierten *N. benthamiana* Zellen wurde bereits gezeigt, dass das Protein Stp1-2NES-HA-YFP, trotz Expression unter der Kontrolle des starken 35S-Promotors, ausschließlich in cytoplasmatischen Aggregaten zu finden ist (nicht gezeigt). Daher sollte auch bei Expression des Proteins in *U. maydis* und Translokation in die Pflanzenzelle eine mögliche Lokalisation im Pflanzenzellkern unterbunden werden.

Sollte es möglich sein, einen Transfer experimentell zu bestätigen, so könnten die ermittelten Interaktionspartner als Köderproteine in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen verwendet werden, um durch deren Interaktionspartner Schlüsse auf die Signalwege oder Mechanismen ziehen zu können, mit denen Stp1 interferiert.

Für den Fall, dass Stp1 im Apoplasten wirkt und nicht in die Pflanzenzelle transloziert wird, könnte eine Split-Ubiquitin-Analyse zur Identifikation von interagierenden Pilz oder Pflanzen-Membranproteinen durchgeführt werden. Möglicherweise agiert Stp1 jedoch in der löslichen Fraktion des Apoplasten. Aufgrund des dort herrschenden sauren pH-Wertes (Yu *et al.*, 1999) könnte die Identifikation von apoplastischen Interaktionspartnern in Hefe-Systemen schwierig sein, da in diesem System Interaktionen entweder im Cytosol oder im Kern getestet werden. In diesem Fall wären wiederum Co-Immünpräzipitationen aus Extrakten infizierter Pflanzen oder Affinitäts-Reinigungen mit rekombinanten Stp1 sinnvollere Ansätze. In diesen

Experimenten könnte zudem der pH-Wert an die physiologischen Bedingungen angepasst werden.

In jedem Fall wäre die Gewinnung löslichen rekombinanten Proteins von Vorteil, da dies nicht nur für die Identifizierung von Interaktionspartnern über Affinitätsäulen, sondern auch für Strukturanalysen durch Kristallisation verwendet werden könnte. Zwar konnte Stp1 bislang nur in Inklusionskörpern oder stark degradiert in *E. coli* produziert werden. Dennoch sollte durch die Variation von Affinitätstags und Expressionsstämmen versucht werden, eine Produktion löslichen Proteins zu erreichen. Beispielsweise könnte die Verwendung eines Thioredoxin-tags die Löslichkeit des Proteins erhöhen (LaVallie *et al.*, 1993). Zudem sollte versucht werden, das Protein Stp1 $\Delta$ 136-339 heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Da dieses voll funktionstüchtig ist und die möglicherweise für die Produktion in *E. coli* ungünstige Glycin-reiche Region deletiert ist, könnte dies möglicherweise dem Abbau entgegenwirken. Im Fall von AvrPto wurde nach Strukturaufklärung eine Ähnlichkeit mit RING-E3-Ubiquitin-Ligasen deutlich, woraus entscheidende Hinweise auf die Funktion der Proteins – die Mimikry dieser Ligase - ermittelt werden konnte (Janjusevic *et al.*, 2006). Strukturelles Mimikry stellt auch bei bakteriellen Virulenzfaktoren eine weitverbreitete Strategie dar (Desveaux *et al.*, 2006; Stebbins *et al.*, 2001). Durch die Kristallstruktur könnte daher möglicherweise ebenfalls auf eine Funktion von Stp1 geschlossen werden.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von der Qualität *p. a.* und wurden vorwiegend von den Firmen Difco (Augsburg), Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Asubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden 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.

### 4.2 Zellkultivierung

#### 4.2.1 *E. coli* und *A. tumefaciens*

*E. coli* sowie *A. tumefaciens* Stämme wurden in dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Antibiotikazugaben erfolgten nach den in Tabelle 8 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

**Tabelle 8: Für Bakterienkulturen verwendete Antibiotika.**

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml
Chloramphenicol (Cam)	34 µg/ml
Tetrazyklin (Tet)	2,5 µg/ml
Rifampezin (Rif)	50 µg/ml
Genamycin (Gen)	40 µg/ml
Zeocin (Zeo)	100 µg/ml
Streptomycin (Str)	50 µg/ml
dYT-Flüssigmedium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	1,6 % (w/v) Trypton-Pepton 1,0 % (w/v) Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl in dH <sub>2</sub> O, autoklaviert
YT- Festmedium	0,8 % (w/v) Trypton-Pepton 0,5 % (w/v) Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl 1,3 % (w/v) Agar in dH <sub>2</sub> O, autoklaviert

Für die Amplifizierung von *P. pastoris* Vektoren, die Zeo-Resistenz vermittelten, wurden *E. coli* Kulturen in *Low Salt* Luria-Bertani (LB)-Medium kultiviert.

<i>Low Salt</i> LB-Medium, pH 7,0	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) NaCl [1,5% (w/v) Agar für Festmedium] in dH <sub>2</sub> O, autoklaviert
-----------------------------------	--

#### 4.2.2 *U. maydis*

In dieser Arbeit verwendete *U. maydis* Kulturen wurden standardmäßig in Yeps<sub>light</sub>-Flüssigmedium bei 200 Upm inkubiert. Für Festmedien wurden Potato-Dextrose-Agarplatten, ggf. mit entsprechenden Antibiotikazusätzen (Tabelle 9), verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50% NYT-Glyzerin zu einer dicht gewachsenen Kultur.

**Tabelle 9: Für die Kultivierung von *U. maydis* Derivaten eingesetzte Antibiotika.**

Antibiotikum	Konzentration
Carboxin (Cbx)	2 µg/ml
Hygromycin (Hyg)	ca. 200 µg/ml (je nach Charge variabel)
Nourseothricin (Nat)	150 µg/ml
Phleomycin (Phleo)	5 µg/ml

Yeps <sub>light</sub> (modifiziert nach Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	1% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton 1% (w/v) Saccharose
Potato-Dextrose-Agar (PD)	2,4% (w/v) Potato-Dextrose Broth 2% (w/v) Bactoagar
NSY-Glyzerin	0,8% (w/v) Nutrient Broth 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) Saccharose 69,6% (v/v) Glyzerin

Für Stressmedien wurden Complete Festmedium-Platten mit Glukose (CM-Glk) die folgenden Stress-induzierenden Substanzen zugefügt: 100 bzw. 150 µg/ml Calcofluor White (Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich), 1 bzw. 1,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 45 µg/ml Kongorot (Sigma-Aldrich) sowie 1 M NaCl und 1 M Sorbitol. Filamentationstests wurden auf PD-Charcoal-Platten durchgeführt.

CM Vollmedium (Holliday, 1974)	0,6% (w/v) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1% (w/v) Casaminosäuren 0,1% (w/v) Heringsperma-DNA 2% (w/v) Hefeextrakt 2% (v/v) Vitaminlösung Nach dem Autoklavieren: 2 % (w/v) Glukose oder Arabinose
Vitaminlösung (Holliday, 1974)	0,1‰ (w/v) Thiamin 0,05‰ (w/v) Riboflavin 0,05‰ (w/v) Pyridoxin 0,2‰ (w/v) Kalziumpantothenat 0,05‰ (w/v) para-Aminobenzoesäure

	0,2‰ (w/v) Nikotinsäure 0,2‰ (w/v) Cholinchlorid 1,0‰ (w/v) myo-Inositol sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C
PD-Vollmedium	2,4% (w/v) Potato-Dextrose Broth 2,0% (w/v) Bactoagar in dH <sub>2</sub> O, autoklaviert
PD-Charcoal	wie PD-Vollmedium, jedoch zusätzlich 1,0% (w/v) Aktivkohle

Der *U. maydis* Stamm AB33 und dessen Derivate wurden in Ammonium-Minimal (AM-MM) bzw. Nitrat-Minimalmedium (NM-MM) kultiviert, um den Nitrat-induzierbaren Promotor  $P_{nar}$  zu reprimieren bzw. zu induzieren.

AM-MM (Holliday, 1974)	0,3% (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6,25 (v/v) Salz-Lösung (s. u.) in H <sub>2</sub> O; pH 7,0 (NaOH) nach dem Autoklavieren: 2% (w/v) Glukose
NM-MM (Holliday, 1974)	0,3% (w/v) KNO <sub>3</sub> 6,25% (v/v) Salz-Lösung (s. u.) in H <sub>2</sub> O; pH 7,0 (NaOH) nach dem Autoklavieren: 2% (w/v) Glukose
Salzlösung (Holliday, 1974)	1,6% (w/v) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4% (w/v) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,8% (w/v) KCl 0,4% (w/v) MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,132% (w/v) CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,8% (v/v) Spurenelement-Lösung in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
Spurenelementlösung	6‰ (w/v) H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 14‰ (w/v) MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O 40‰ (w/v) ZnCl <sub>2</sub> 4‰ (w/v) NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 10‰ (w/v) FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 4‰ (w/v) CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O in dH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert

#### 4.2.3 *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde bei 28°C und 200 Upm aerob angezogen. Als Vollmedium diente YEPD-Medium. Für Stämme mit Auxotrophien wurde SD-Medium mit den entsprechenden Aminosäure-Supplementen eingesetzt. Für Dauerkulturen wurde 25% (v/v) Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

YEPD-Medium	2% (w/v) Pepton (Difco) 1% (w/v) Hefeextrakt 2% (w/v) Agar nach dem Autoklavieren: 0,003% (w/v) Adenin
-------------	--

SD-Basismedium	0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Aminosäuren gewünschte Aminosäure-Supplemente [Festmedium: 2% (w/v) Agar] nach dem Autoklavieren: 2% (w/v) Glukose
Aminosäure-Supplemente zur Komplementation von SD-Basismedien	0,002% (w/v) L-Adenin Hemisulfat 0,002% (w/v) L-Arginin HCl 0,002% (w/v) L-Histidin HCl Monohydrat 0,003% (w/v) L-Isoleucin 0,01% (w/v) L-Leucin 0,003% (w/v) L-Lysin HCl 0,002% (w/v) L-Methionin 0,005% (w/v) L-Phenylalanin 0,02% (w/v) Threonin 0,002% (w/v) L-Tryptophan 0,003% (w/v) L-Tyrosin 0,002% (w/v) L-Uracil 0,015% (w/v) L-Valin

#### 4.2.4 *P. pastoris*

Die Kultivierung von *P. pastoris* wurde nach dem Invitrogen „EasySelect *Pichia* Expression Kit“ Handbuch in BMGY- and BMMY-Medium bei 28°C und 200 Upm durchgeführt.

BMGY/BMMY-Medium	1% (w/v) Hefe-Extrakt 2% (w/v) Pepton 100 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,0 1,34% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o Aminosäuren 4 x 10 <sup>-5</sup> % (w/v) Biotin 1% (v/v) Glyzerol (BMGY) bzw. 0,5% (v/v) Methanol (BMMY)
------------------	--

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

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

### 4.3 Stämme, Oligonukleotide und Vektoren

#### 4.3.1 *E. coli* Stämme

In Tabelle 10 sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und deren Verwendungszweck dargestellt.



Tabelle 10: Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz/Bezug
K-12 Top10 [F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacO</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> ]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	Grant <i>et al.</i> (1990)/ Invitrogen (Karlsruhe)
K-12 DH5α [F <sup>-</sup> Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ) <i>phoA supE44 λ thi1 gyr</i> A96 <i>relA1</i> ]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	Hanahan (Hanahan, 1983)/ Gibco/BRL (Eggenstein)
BL21 Rosetta (DE3)pLysS [F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLacIRARE (Cam <sup>R</sup> )]	Proteinexpression (Stp1ΔN) Kodiert für sechs seltene tRNAs (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) auf einem kompatiblen Cam <sup>R</sup> Plasmid. Der BL21-Hintergrund vereinfacht die Proteinexpression durch das Fehlen zweier Proteasen (OmpT und Ion)	Novagen/Merck (Darmstadt)
BL21 Rosetta-gami (DE3) pLysS [Δ <i>ara-leu</i> 7697 Δ <i>lacX</i> 74 Δ <i>phoA PvuII</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F <sup>-</sup> [ <i>lac</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>p</sup> <i>pro</i> ] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> pRARE (Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )]	Proteinexpression (Stp1ΔN) K-12 Origami-Derivat; es ist eine vereinfachte Bildung von zytoplasmatischen Disulfidbrücken durch das Fehlen zweier Enzyme (TrxB und Gor) gegeben, wodurch Kan und Tet-Selektion notwendig werden.	Novagen/Merck (Darmstadt)
ER2566 <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal</i> <i>sulA11 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2</i> [ <i>dcm</i> ]R( <i>zgb-210::Tn10--TetS</i> ) <i>endA1</i> Δ( <i>mcrC-mrr</i> )114::IS10	Proteinexpression (IMPACT-TWIN) Ermöglicht die Produktion einer Proteinfusion mit einem Intein, das eine induzierbare Autospaltaktivität besitzt. So kann der tag nach der Proteinreinigung einfach abgespalten werden.	NEB (Frankfurt a. M.)

#### 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. 4.3.8.3), die Kan-Resistenz vermitteln.

#### 4.3.3 *U. maydis* Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* Ausgangsstämme (Tabelle 11), sowie die in dieser Arbeit hergestellten Stämme (Tabelle 12), beschrieben.

Tabelle 11: *U. maydis* Ausgangsstämme.

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	Phleo	Kämper <i>et al.</i> , 2006
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989

CL13	<i>a1 bE1 bW2</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995
AB33	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2, bE1</i>	Phleo	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
SG200Δ5B	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> [Δ <i>um02473-um02475</i> ]	Phleo, Hyg	Münch, K., MPI Marburg; Kämper <i>et al.</i> , 2006
SG200Δkex2	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δkex2</i>	Phleo, Hyg	Rössel, N., MPI Marburg
SG200AM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>um01779</sub>:egfp] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> , 2008
SG200GFP <sub>cyt</sub>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:egfp] ip<sup>s</sup><sup>1</sup></i>	Phleo, Cbx	Treitschke, S., MPI Marburg
SG200RFP <sub>cyt</sub>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:rfp] ip<sup>s</sup><sup>1</sup></i>	Phleo, Cbx	Fuchs, U., MPI Marburg

<sup>1</sup> Es handelt sich um Mehrfachintegrationen im *ip*-Lokus.

**Tabelle 12: Liste der in dieser Arbeit generierten *U. maydis* Stämme<sup>1</sup>.**

Name	Bezeichnung	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
KS01	SG200Δ <i>um02473</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>Δum02473::egfp</i>	Phleo, Nat	SG200
KS02	SG200Δ <i>um02474</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>Δum02474::egfp</i>	Phleo, Cbx	SG200
KS03	SG200Δ <i>stp1</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>Δum02475::egfp</i>	Phleo, Hyg	SG200
KS04	SG200Δ <i>um02473</i> Δ <i>um02474</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> [Δ <i>um02473-um02474</i> ]	Phleo, Hyg	SG200
KS05	SG200Δ <i>stp1-stp1</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS06	FB1Δ <i>stp1</i>	<i>a1 b1 Δum02475</i>	Hyg	FB1
KS07	FB2Δ <i>stp1</i>	<i>a2 b2 Δum02475</i>	Hyg	FB1
KS08	CL13Δ <i>um02473</i> Δ <i>um02474</i>	<i>a1 bE1 bW2</i> [Δ <i>um02473-um02474</i> ]	Phleo, Hyg	CL13
KS09	SG200 <i>stp1-GFP</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 um02475:egfp</i>	Phleo, Hyg	SG200
KS10 <sup>2</sup>	SG200RFP <sub>cyt</sub> <i>stp1-GFP</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 um02475:egfp</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:rfp] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg Cbx	KS09
KS11	SG200 <i>stp1-RFP</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 um02475:rfp</i>	Phleo, Hyg	SG200
KS12	SG200 <i>Potefstp1</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:stp1] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS13	SG200 <i>Potefstp1-GFP</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:stp1:egfp] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS14 <sup>3</sup>	AB33 <i>Potefstp1</i>	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2, bE1 ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:stp1] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	AB33
KS15 <sup>3</sup>	AB33 <i>Potefstp1-GFP</i>	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2, bE1 ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:stp1:egfp] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	AB33
KS16	SG200Δ <i>stp1-stp1</i> Δ136-339	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp</i> <i>ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1Δ136-339] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS17	SG200Δ <i>stp1-</i>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp</i>	Phleo, Hyg,	KS03

	stp1Δ40-390	<i>ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1Δ40-390]ip<sup>s</sup></i>	Cbx	
KS18	SG200Δstp1-stp1Δ36-136	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1Δ36-136]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS19	SG200Δstp1-stp1Δ339-515	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1Δ339-515]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS20	SG200Δstp1-stp1Δ432-515	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1Δ432-515]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS21	SG200stp1Δ371-515	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 um02475Δ371-515::egfp</i>	Phleo, Hyg	SG200
KS22	SG200stp1Δ390-515	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 um02475Δ390-515::egfp</i>	Phleo, Hyg	SG200
KS23	SG200Δstp1-stp1Δcys	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1cys-ala]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS24	SG200stp1-mcherryHA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1:mcherryHA]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS25	SG200stp1(SP)-mcherryHA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1Δ29-515:mcherryHA]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	SG200
KS26	SG200Δkex2-Potefstp1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δkex2 ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:stp1]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200Δkex2
KS27 <sup>3</sup>	SG200Δstp1AM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>um01779</sub>:gfp] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	KS03
KS28 <sup>3</sup>	SG200Δstp1GFP <sub>cyt</sub>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:gfp] ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Cbx	KS03
KS29	SG200Potef stp1Δkex	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>otef</sub>:stp1Δkex]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS30	SG200stp1-HA	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1HA]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS31	SG200stp1-FLP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02475::egfp ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1:flp]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	KS03
KS32	SG200stp1FLP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2 ip<sup>r</sup> [P<sub>stp1</sub>:stp1:flp]ip<sup>s</sup></i>	Phleo, Hyg, Cbx	SG200

<sup>1</sup> Die zur Herstellung der Stämme verwendeten Plasmide sind in Abschnitt 4.3.7 aufgeführt. Bei Mutanten mit Integrationen im *ip*-Lokus wurden wenn möglich Stämme mit Einzelintegration verwendet. Ausnahmen sind im Stammverzeichnis vermerkt. Wenn nicht anderes gekennzeichnet, wurden die Stämme durch Southern Blot-Analysen verifiziert. In Einzelfällen wurden PCR-Analysen zur Bestimmung von *ip*-Plasmidintegrationen durchgeführt. Von jeder Mutante wurden mindesens zwei unabhängig generierte Stämme konserviert. Die Nomenklatur für Integrationen im *ip*-Lokus wurde aus Brachmann (2001) übernommen.

<sup>2</sup> Von dem gekennzeichneten Stamm existieren ausschließlich Mutanten mit Mehrfachintegrationen im *ip*-Lokus.

<sup>3</sup> Die gekennzeichneten Stämme wurden mittels PCR auf die erfolgreiche Integration des jeweiligen Konstruktes in den *ip*-Lokus untersucht.

#### 4.3.4 *S. cerevisiae* Stämme

Für die Identifizierung von Stp1 Interaktionspartnern 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. Außerdem wurden Apoptose-Inhibitionsversuche mit dem Stamm YHUM0472, freundlicherweise von der AG Mösch der Philipps-Universität Marburg (Abt.

Genetik) zur Verfügung gestellt, durchgeführt. Dieser Stamm besitzt Auxotrophien für Uracil, Tryptophan und Leucin.

#### 4.3.5 *P. pastoris* Stämme

Stp1-Expressionsversuche wurden in den Stämmen *P. pastoris* X33 (Wildtyp Stamm; Mut<sup>+</sup>) und GS115 (Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>; beide Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Für die Expression wurden die Stämme mit den entsprechenden Plasmiden transformiert (vgl. 4.3.5). Es wurde sowohl das Stp1-Signalpeptid als auch das  $\alpha$ -Sekretionssignal von *P. pastoris* für die Sekretion von Stp1 $\Delta$ N eingesetzt.

#### 4.3.6 Oligonukleotide

In der Tabelle 13 werden alle in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Oligonukleotide aufgeführt. Die Oligonukleotide tragen neben der oKS-Laufnummer eine Bezeichnung, die zumeist auf die Verwendung und enthaltene Restriktionsschnittstellen rückschließen lässt.

**Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide<sup>1</sup>.**

Laufnummer	Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Verwendung
<b>oKS1</b>	2473-lb1	ATCCGAGATAGAGTCGCGAGTGTG	Amplifizierung der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02473; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS2</b>	2473-lb2	CACGGCCATCTAGGCCGAATTCGAGTTTCTGTGCGAGT	Amplifizierung der 5-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02473; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS3</b>	2473-rb1	CATTGCTGCCCTGCTGCAGTCG	Amplifizierung der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02473
<b>oKS4</b>	2473-rb2	GTGGGCCTGAGTGGCCCGCATCCTAAAGTCGCCAGTTGA	Amplifizierung der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02473; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS5</b>	2474-lb1	AGCTCCAGAGCGGTACCTGCTCC	Amplifizierung der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02474
<b>oKS6</b>	2474-lb2	CACGGCCATCTAGGCCGCACAAAGTCCACTGCACGACTCG	Amplifizierung der 5-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02474; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS7</b>	2474-rb1	CAAGTGGCGACATACCCAACACCGC	Amplifizierung der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02474
<b>oKS8</b>	2474-rb2	GTGGGCCTGAGTGGCCTCCTGAGCAGTTCGAGTCTCTCTCC	Amplifizierung der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02474; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS9</b>	2475-lb1	AACCAGACAAAGTATCAGTTACAGC	Amplifizierung der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02475
<b>oKS10</b>	2475-lb2	CACGGCCATCTAGGCCCTCTGCTTTATTTTCTCGATAAAGTTG	Amplifizierung der 5-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02475; führt <i>Sfi</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS11</b>	2475-rb1	TTTCTCGCAGCAATCGGTGCTGA	Amplifizierung der 3'-Flanke

		G	für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02475
<b>oKS12</b>	2475-rb2	GTGGGCCTGAGTGGCCAGCTCT GCTGTAAAGAATCACGAA	Amplifizierung der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt $\Delta$ um02475; führt <i>Sfi</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS13</b>	2473nested-lb	CAACGGCCAGCAGTCTGTTCAG C	Amplifizierung des Deletionskonstruktes $\Delta$ um02473
<b>oKS14</b>	2473nested-rb	GCAGTTGTTGCTTGCCTGTGG G	Amplifizierung des Deletionskonstruktes $\Delta$ um02473
<b>oKS15</b>	2474nested-lb	TTGAGGGTGCTGTAGCCATCAA GG	Amplifizierung des Deletionskonstruktes $\Delta$ um02474
<b>oKS16</b>	2474nested-rb	GTGGGATCATACCCGTCGCATA GG	Amplifizierung des Deletionskonstruktes $\Delta$ um02474
<b>oKS17</b>	2475nested-lb	TGTAGACAGGTGCTTGTACCAA GG	Amplifizierung des Deletionskonstruktes $\Delta$ um02475
<b>oKS18</b>	2475nested-rb	AATCTCGCAGTCAGCCTGTTTAG G	Amplifizierung des Deletionskonstruktes $\Delta$ um02475
<b>oKS19</b>	02475eGFP-lb1	TGTGCCCGGGGATGTCTGGT GG	Amplifizierung der 5'-Flanke für die <i>um02475:egfp</i> -Fusion im nativen Lokus
<b>oKS21</b>	02475eGFP-nested-lb	GTTTCGGTGCTAACACAGGCTAT C	Amplifizierung des Kontruktes für die <i>um02475:GFP</i> -Fusion im nativen Lokus
<b>oKS34</b>	um02475-GFP_seq1-fw	TGTGACACTGTCCCTGAACAG	Sequenzierprimer für <i>um02475</i> und Fusionen
<b>oKS35</b>	um02475-GFP_seq3-fw	ATGGCGACAGTGATGGCGATG	Sequenzierprimer für <i>um02475</i> und Fusionen
<b>oKS36</b>	um02475-GFP_seq4-rev	CTTCTAGGTTTGAGAACGGAG	Sequenzierprimer für <i>um02475</i> und Fusionen
<b>oKS49</b>	02475-OMA-fw (NdeI)	CCGCCATATGAGAGCCGTGCTC TCGCTCAACATG	Fusion von <i>um02475</i> mit $P_{oma}$ ; führt <i>Nde</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS50</b>	02475-OMA-rev (NotI)	AGCGGCCGCCTAACGAGAAGGA GGAGGTGCCATGGTC	Fusion von <i>um02475</i> mit $P_{oma}$ ; führt <i>Not</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS53</b>	02475eGFP_lb2_S-linker	CACGGCCGCGTTGGCCCCGGTG GCGATCGAGCGACGAGAAGGA GGAGGTGCCATGGTC	Amplifizierung des Kontruktes für die <i>um02475:egfp</i> -Fusion im nativen Lokus; führt <i>Sfi</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS91</b>	2Hyb02475-N_rev	TCGACGGATCCCACGAGAAGGA GGAGGTGCC	Amplifizierung von <i>um02475</i> für Insertion in den Vektor pGBKT7; führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein
<b>oKS102</b>	Flpfusion/Not_rev	CACCACGCGGCCGCTTAGATGC GACGGTTGATGTAC	Amplifizierung von <i>um02475</i> für die <i>flp</i> -Fusion; führt <i>Not</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS105</b>	pB563_stp1/XbaI_fw	CACTGCTCTAGATGAACGGCTC GATCTCGAACGCG	Amplifizierung von <i>um02475</i> für Integration in den Vektor pB563; führt <i>Xba</i> I-Schnittstelle ein
<b>oKS106</b>	pB563_stp1/BamHI_rev	CTAGTGGGATCCCTAACGAGAA GGAGGAGGTGC	Amplifizierung von <i>um02475</i> für Integration in den Vektor pB563; führt <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ein
<b>oKS117</b>	75Com/HindIII_fw	GTGAAGCTTATTCCAAGCACAA AGTCCACTGCAC	Amplifizierung von <i>um02475</i> für die Komplementation von $\Delta$ um02475 im <i>ip</i> -Lokus; führt <i>Hind</i> III-Schnittstelle ein
<b>oKS120</b>	371/390nested-lb1	GCTGGAGGTTTGCCTGGAGGTG	Amplifizierung der Kontrukte <i>um02475<math>\Delta</math>371/<math>\Delta</math>390-515:egfp</i>
<b>oKS124</b>	Stp1_C1-Amut	TGGCGGATGGATGGCCATCCAC	Mutagenese von <i>um02475</i> zum

		GTTACTCC	Austausch von für Cysteinreste kodierenden Kodons
<b>oKS125</b>	Stp1_C2-Amut	CCGAAAGTGCTGATGGCCATCA ATGGCGATC	Mutagenese von <i>um02475</i> zum Austausch von für Cysteinreste kodierenden Kodons
<b>oKS130</b>	Tobacco_Stp1_29-136	CTCAGT <u>GCGGCCG</u> CCCGTCGCG ATTGAGCGCTTGGGAACATCAG CTGGGGGAGTAACGTGG	Amplifizierung von <i>um02475</i> -Bereichen für die Insertion in den pGreenII-Vektor, führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS131</b>	Tobacco_Stp1_29-339	CTCAGT <u>GCGGCCG</u> CCCGTCGCG ATTGAGCGGATGTAGCCAGCAG GGACGGTGCTGCCTTGG	Amplifizierung von <i>um02475</i> -Bereichen für die Insertion in den pGreenII-Vektor, führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS132</b>	Tobacco_Stp1_29-371	CTCAGT <u>GCGGCCG</u> CCCGTCGCG ATTGAGCGTGAGAGTGTGGCT GGCTCGCCGCGGTTCC	Amplifizierung von <i>um02475</i> -Bereichen für die Insertion in den pGreenII-Vektor, führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS133</b>	Tobacco_Stp1_29-390	CTCAGT <u>GCGGCCG</u> CCCGTCGCG ATTGAGCGGTGAATGAAAGTGT TCAGGAACAGCGTCG	Amplifizierung von <i>um02475</i> -Bereichen für die Insertion in den pGreenII-Vektor, führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS134</b>	Tobacco_Stp1g_rich	CACCACTCATGA <u>AAGCAAGCTGA</u> TGGAGGAGCAGGTACGCGCTCT GG	Amplifizierung von <i>um02475</i> -Bereichen für die Insertion in den pGreenII-Vektor; führt eine <i>BspHI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS135</b>	Tobacco_Stp1g_rich_r	CTCAGT <u>GCGGCCG</u> CCCGTCGCG ATTGAGCGGTAGCCAGCAGGGA CGGTGCTGCCTTGGCC	Amplifizierung von <i>um02475</i> -Bereichen für die Insertion in den pGreenII-Vektor, führt eine <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS145</b>	Stp1Dgrich_fw_Sfi	GAGGGCCGCACCGGCCCGGGA ACATCAGCTGGGGGAGTAACGT GGATGC	Primer für inverse PCR zur Gewinnung von <i>um02475Δ136-339</i> in p123; inseriert <i>SfiI</i> -Schnittstelle
<b>oKS146</b>	Stp1Dgrich_rev_Sfi		Primer für inverse PCR zur Gewinnung von <i>um02475Δ136-339</i> in p123; inseriert <i>SfiI</i> -Schnittstelle
<b>oKS147</b>	Stp1_cDNA_fw	ATGAGAGCCGTGCTCTCGCTC	Primer zur Amplifizierung der <i>stp1 (um02475)</i> cDNA
<b>oKS148</b>	Stp1_cDNA_rev	CTAACGAGAAGGAGGAGGTGC	Primer zur Amplifizierung der <i>stp1 (um02475)</i> cDNA
<b>oKS149</b>	p123_Otef_Seq_fw	CTGTCTCGGCACTATCTTTC	Primer für die Sequenzierung von Genen, die mit P <sub>otef</sub> fusioniert wurden (5'-Richtung)
<b>oKS150</b>	p123_Rev	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTC	Primer für die Sequenzierung von Genen, die in 3'-Richtung vor dem <i>nos</i> -Terminator liegen
<b>oKS151</b>	75detect_fw	AGGTA <u>CTGCGGCCG</u> GTGCGGC	Bindet in <i>um02475</i>
<b>oKS152</b>	75detect_rev	GCGGATGTAGCCAGCAGGGAC	Bindet in <i>um02475</i>
<b>oKS153</b>	Stp1/BspHI_fw	CAC <u>T</u> CATGAGAGCCGTGCTCTC GCTCAAC	Primer zur Amplifizierung von <i>um02475Δ1-28</i> , der eine <i>BspHI</i> -Schnittstelle am 5'-Ende des Gens inseriert
<b>oKS156</b>	Delta36-136Mlu_fw	CACGAGAC <u>GCGT</u> CGCAAGCTGA TGGAGGAGCAGGTAC	Primer für inverse PCR zur Gewinnung von <i>um02475Δ136-136</i> ; führt eine <i>MluI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS157</b>	Delta36-136Mlu_rev	CAGGCCAACGGCTCGATCTCGA <u>ACGCGT</u> CGCACC	Primer für inverse PCR zur Gewinnung von <i>um02475Δ136-136</i> ; führt eine <i>MluI</i> -

			Schnittstelle ein
<b>oKS158</b>	Delta339-515speIrev	AAGGCAGCACCGTCCCTGCTGG CTAC <u>ACTAGT</u> CACGAG	Primer für inverse PCR zur Gewinnung von <i>um02475Δ339-515</i> ; führt eine <i>SpeI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS161</b>	Delta432-515speIrev	AAGCCCGCTTCAAACGCAAATG CTCCG <u>ACTAGT</u> CACGAG	Primer für inverse PCR zur Gewinnung von <i>um02475Δ432-515</i> ; führt eine <i>SpeI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS169</b>	RT_stp1_fw	CTGCTGTACCAGCTATCAAG	Q-PCR Primer zur Detektion von <i>um02475</i>
<b>oKS170</b>	RT_stp1_rev	GTAGTTGGGCAGATTGGTG	Q-PCR Primer zur Detektion von <i>um02475</i>
<b>oKS171</b>	pAD-library_seq-fw	TCTATTCGATGATGAAGATAC	Primer für die Sequenzierung von Genen im Beutevektor
<b>oKS172</b>	pAD-library_seq-rev	CAGAGATCTATGAATCGTAGA	Primer für die Sequenzierung von Genen im Beutevektor
<b>oKS192</b>	Tobacco_Stp1_29-199	CTCAGTGC GGCCCGCCGTCGCG ATTGAGCGAGCACCTCCGACAT ACCCACCAGACATACC	Primer für Gewinnung verkürzter <i>um02475</i> -Versionen zur Insertion in pGreenII, führt <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS193</b>	Tobacco_Stp1_29-279	CTCAGTGC GGCCCGCCGTCGCG ATTGAGCGACCGGTACCAGCCC CCATACCGCC	Primer für Gewinnung verkürzter <i>um02475</i> -Versionen zur Insertion in pGreenII, führt <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS194</b>	Tobacco_Stp1 CLongB	CACCACTCATGATCCGCTACAA CGGTACGCTGATGAC	Primer für Gewinnung von <i>um02475</i> -Genbereichen zur Insertion in pGreenII, führt <i>BspHI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS195</b>	Tobacco_Stp1 CKex2 B	CACCACTCATGATGCTCCAGAC AGACACATCG	Primer für Gewinnung von <i>um02475</i> -Genbereichen zur Insertion in pGreenII, führt <i>BspHI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS196</b>	Tobacco_Stp1 CKex3 B	CACCACTCATGAAACGTCAGGC CTCTACCTCGGCGAC	Primer für Gewinnung von <i>um02475</i> -Genbereichen zur Insertion in pGreenII, führt <i>BspHI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS197</b>	Tobacco_Stp1 Cterm_fw	CACCACTCATGAATGCTCCGAA AGTGCTGATGTGCATCAATGGC G	Primer für Gewinnung von <i>um02475</i> -Genbereichen zur Insertion in pGreenII, führt <i>BspHI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS200</b>	Tobacco_Stp1f ull_fw	CACCACTCATGAGAGCCGTGCT CTCGCTCAACATGACC	Primer für Amplifizierung von <i>um02475</i> zur Insertion in pGreenII, inseriert eine <i>BspHI</i> -Schnittstelle
<b>oKS201</b>	Tobacco_fw/Bs pHI	CACTCATGAGAGCCGTGCTCTC GCTCAAC	Primer für Amplifizierung von <i>um02475Δ1-28</i> zur Insertion in pGreenII, inseriert eine <i>BspHI</i> -Schnittstelle
<b>oKS202</b>	pGreenII-sl- stp1/notI	CTCAGTGC GGCCCGCCGTCGCG ATTGAGCGACGAGAAGGAGGAG GTGCCATGGTCATGTTAGTCTCG	Primer zur Amplifizierung von <i>um02475</i> zur Insertion in pGreenII, führt <i>NotI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS203</b>	M13-fw	GTAAAACGACGGCCAG	5'-Sequenzierprimer für pCR-TOPO-Vektoren
<b>oKS204</b>	M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	3'-Sequenzierprimer für pCR-TOPO-Vektoren
<b>oKS205</b>	FRTexcisionde tect_fw	TAGGAACTTCGAATTCGTA	Primer zur Detektion der Spacer-Exzision in FRT-Maisreporterpflanzen

<b>oKS206</b>	FRTexcisionde tect_rev	GATTACGAATTCGAAGTTCC	Primer zur Detektion der Spacer-Exzision in FRT- Maisreporterpflanzen
<b>oKS207</b>	DeltaCtermsH A_fw	CACGAGACTAGTTACCCCTACG ACGTCCCCGACTACG	Primer für Amplifizierung 3'- verkürzter <i>um02475</i> -Versionen; führt <i>BspHI</i> -Schnittstelle ein
<b>oKS208</b>	02475-OMA- fw (NdeI)	CCGCCATATGAGAGCCGTGCTC TCGCTCAACATG	Amplifizierung von <i>um02475</i> für die Insertion in pOMA- sGFP; inseriert eine <i>NdeI</i> - Schnittstelle
<b>oKS209</b>	02475-OMA- rev (NotI)	AGCGGCCGCCTAACGAGAAGGA GGAGGTGCCATGGTC	Amplifizierung von <i>um02475</i> für die Insertion in pOMA- sGFP; inseriert eine <i>NotI</i> - Schnittstelle
<b>oKS210</b>	pGreen_SIP12f ished_fw	CACCACACGCGTTGGGCACGAG GGAGAAAGGGAATTGGC	Insertion von <i>sip12</i> in pGreenII; inseriert eine <i>BspHI</i> - Schnittstelle
<b>oKS211</b>	pGreen_SIP12f ished_rev	CTCAGTGC GGCCGCTGTGCCCC AGCAATAGCTAGATG	Insertion von <i>sip12</i> in pGreenII; inseriert eine <i>NotI</i> -Schnittstelle
<b>oKS212</b>	pGreen_Sip10f ished_NcoI_fw	CACCACCCATGGGCACGAGGTC GTCGGCCG CACTGG	Insertion von <i>sip10</i> in pGreenII; inseriert eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle
<b>oKS213</b>	pGreen_Sip10f ished_NotI_rev	CTCAGTGC GGCCG CCAATAGTA CAAGTGATTGGCAGGTAAC	Insertion von <i>sip10</i> in pGreenII; inseriert eine <i>NotI</i> -Schnittstelle
<b>oKS214</b>	pGreen_SIP2fi shed_MluI_fw	CACCACACGCGTATGGGCACGA GGGGCACACAGTGC GAGCTC	Insertion von <i>sip2</i> in pGreenII; inseriert eine <i>MluI</i> -Schnittstelle
<b>oKS219</b>	rt-ppi-F-2	ACATCGTCAAGGCTATCG	Q-PCR Primer zur Detektion von <i>ppi</i>
<b>oKS220</b>	rt-ppi-R-2	AAAGAACACCGGACTTGG	Q-PCR Primer zur Detektion von <i>ppi</i>
<b>oKS225</b>	Stp1_1- 371/390_lb1_f	TGCGACAGCGACACATCGAAG	Primer zur Amplifizierung der 5'-Flanke der Konstrukte <i>um02475Δ371/Δ390-515:gfp</i>

<sup>1</sup> Die Tabelle zeigt die Laufnummer der Oligonukleotide sowie die Bezeichnung, Sequenz (5'-3') sowie die Verwendung. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Fettgedruckte Sequenzen entsprechen einem für die As RSAT kodierenden Linker.

#### 4.3.7 Vektoren

Die im Folgenden dargestellten Vektoren wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Wurden Plasmidteile durch PCR amplifiziert, so wurde die Korrektheit der inserierten DNA-Sequenzen durch Sequenzierungen abgesichert. Soweit nicht anderes vermerkt vermitteln die Plasmide Amp-Resistenz.

##### 4.3.8.1 TA-Vektoren

###### pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die enthaltenen DNA-Abschnitte können mit *EcoRI* herausgeschnitten werden. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet werden. Die Sequenzierung der Inserts ist mittels oKS203 und oKS204 möglich.

###### pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die enthaltenen DNA-Abschnitte können mit *EcoRI* herausgeschnitten werden. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-

Selektion verwendet werden. Die Sequenzierung der Inserts ist mit oKS203 und oKS204 möglich. Unterscheidet sich nur in einigen Restriktionsschnittstellen von pCR2.1-TOPO.

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

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

Leervektor für die Expression von Genen in *E. coli*. Der Vektor enthält einen T7-Promotor und wird für die 5'-Ende Fusion von Genen an eine Sequenz, die für einen 6x-His-tag kodiert, verwendet.

###### pET15b-Stp1ΔN (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde generiert, um Stp1ΔN in *E. coli* zu produzieren. Dabei wurde das *stp1ΔN*-



Gen am 5'-Ende mit einer Sequenz fusioniert, welche für einen 6x-His-tag kodiert.

pTwinII (NEB, Frankfurt)

Leervektor für die Expression von Genen in *E. coli*, der zum IMPACT-TWIN-System gehört (NEB).

pTwinII-Stp1ΔN (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde generiert, um die Eignung des IMPACT-TWIN-Systems (NEB, Frankfurt) für die Expression von löslichem Stp1-Protein in *E. coli* zu testen. Der *stp1* ORF wurde dazu ohne den Abschnitt, der für das Signalpeptid kodiert (Basen 1-84) in den pTwinII-Vektor inseriert. So war eine C-terminale Fusion eines *Protein Splicing Elements* (*Methanobacterium thermoautotrophicum* RIR1-Intein) sowie eine N-terminale Fusion mit einem *Synechocystis* sp. DnaB Intein mit dem *stp1* ORF gegeben. Für die Expression wurde der *E. coli* Stamm ER2566 verwendet.

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

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

p123 L-egfp (Brefort, T., modifiziert nach Aichinger, C., pers. Mitteilung)

p123-Derivat, welches *egfp* unter Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators enthält. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

pUMa364 (AG Feldbrügge, MPI Marburg)

Dieses Plasmid enthält eine mittels *SfiI* inserierte Kasette, mit deren Hilfe *egfp*-Promotorfusionen generiert werden können. Außerdem ist in der Kasette eine  $\text{Nat}^R$  enthalten.

pUMa354 (AG Feldbrügge, MPI Marburg)

Dieses Plasmid enthält eine mittels *SfiI* inserierte Kasette, mit deren Hilfe *egfp*-Promotorfusionen generiert werden können. Außerdem ist in der Kasette eine  $\text{Cbx}^R$  enthalten.

pUMa229 (AG Feldbrügge, MPI Marburg)

Dieses Plasmid enthält eine mittels *SfiI* inserierte Kasette, mit deren Hilfe *egfp*-Promotorfusionen generiert werden können. Außerdem ist in der Kasette eine  $\text{Hyg}^R$  enthalten.

pBS-hhn (Kämper, 2004)

Enthält eine 1884 bp lange  $\text{Hyg}$ -Resistenzkasette als *SfiI*-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator

kontrolliert. Die aus pBS-hhn gewonnene Resistenzkasette wurde standardmäßig für Einzel-Deletionskonstrukte verwendet.

pUMa317 (AG Feldbrügge, MPI Marburg, pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid enthält eine mittels *SfiI* inserierte Kasette, mit deren Hilfe 3'-terminale *egfp*-Genfusionen generiert werden können. Außerdem ist in der Kasette eine  $\text{Hyg}^R$  enthalten.

p123-pep1:mCherryHA (Doehlemann et al., 2008)

Dieses Plasmid ist ein p123\_L\_egfp-Derivat, in das das *U. maydis pep1* Gen unter der Kontrolle des nativen Promotors integriert wurde. Der Vektor diente als Ausgangsplasmid für p123\_Pstp1-stp1mcherryHA und kann durch Linearisierung im *cbx* Gen in den *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert werden.

pCR2.1-TOPOΔum02473 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für Δum02473, das das *egfp* Gen zur Promotorfusion sowie eine  $\text{Nat}^R$ -Kasette einschließt. Die Resistenzkasette stammt aus dem Vektor pUMa364.

pCR2.1-TOPOΔum02474 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für Δum02474, das das *egfp* Gen zur Promotorfusion sowie eine  $\text{Cbx}^R$ -Kasette einschließt. Die Resistenzkasette stammt aus dem Vektor pUMa354.

pCR2.1-TOPOΔum02475 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für Δum02475 (*stp1*), das das *egfp* Gen zur Promotorfusion sowie eine  $\text{Hyg}^R$ -Kasette einschließt. Die Resistenzkasette stammt aus dem Vektor pUMa229.

pCRII-TOPOΔum02473/02474 (diese Arbeit)

Das Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für Δum02473-um02474, das eine  $\text{Hyg}^R$ -Kasette einschließt. Die Resistenzkasette stammt aus dem Vektor pBS-hhn.

p123-Pstp1-stp1 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von KS03 (SG200Δstp1) verwendet. Das *stp1* Gen mit der vorgeschalteten, etwa 700 bp-langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor p123\_L\_egfp inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *egfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert werden und im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1mcherryHA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Expression von *stp1:mcherryHA* in *U. maydis* verwendet und für

die Komplementation von SG200 $\Delta$ stp1 eingesetzt. Die Expression stand dabei unter der Kontrolle des endogenen *stp1* Promotors. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1(SP)mcherryHA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Expression von *stp1(SP)mcherryHA* (kodierend für mCherryHA fusioniert an das Stp1 Signalpeptid) in *U. maydis* verwendet. Die Expression stand dabei unter der Kontrolle des endogenen *stp1* Promotors. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Potef-stp1 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die konstitutive Expression von *stp1* in AB33 und SG200 verwendet. Der *stp1* ORF wurde dazu in den Vektor p123\_L\_egfp inseriert. Das Gen wurde damit unter die Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors gestellt und ist vom *nos*-Terminator am 3'-Terminus flankiert. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Potef-stp1GFP (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die konstitutive Expression von *stp1* in AB33 und SG200 verwendet. Das *stp1* Gen, über einen Linker (kodierend für die Aminosäure-Sequenz RSIAT; Hu *et al.*, 2002) fusioniert mit *egfp* wurde aus SG200 *stp1-gfp* amplifiziert und in den Vektor p123\_L\_egfp inseriert. Das Gen wurde so unter die Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors gestellt und vom *nos*-Terminator am 3'-Ende flankiert. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1HA (diese Arbeit)

Für die Gewinnung dieses Plasmides wurde das *stp1* Gen amplifiziert, wobei eine für den HA-tag kodierende Sequenz am 3'-Terminus angefügt wurde. Die Sequenz für den HA-tag wurde anhand der *U. maydis* Kodon Präferenz-Tabelle für die Expression in *U. maydis* optimiert. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1 $\Delta$ 339-515HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand mittels inverser PCR, wobei das Plasmid p123\_Pstp1-stp1#16 als Matrize diente. Die für die As 339-514 von Stp1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und so im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1 $\Delta$ 36-136HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123\_Pstp1-stp1-HA als Matrize diente. Die für die As 36-136 von Stp1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert. Das Plasmid

kann im *cbx* Gen linearisiert und so im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1 $\Delta$ 432-515HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123\_Pstp1-stp1-HA als Matrize diente. Die für die As 432-514 von Stp1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und so im *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Pstp1-stp1  $\Delta$ 339-515HA (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand durch inverse PCR, wobei das Plasmid p123\_Pstp1-stp1-HA als Matrize diente. Die für die As 339-514 von Stp1 kodierenden Basenpaare wurden dabei deletiert. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und so im *ip*-Lokus inseriert werden.

pAM1 (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009)

Dieses Plasmid wurde zur Herstellung von SG200 $\Delta$ stp1-AM1 verwendet. Es dient der Expression von cytosolischem GFP unter der Kontrolle eines Promotors, der in Zellen aktiv ist, die Appressorien ausbilden. Diese Eigenschaft kann als Reporter für die Bildung von Appressorien verwendet werden. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert und im *ip*-Lokus inseriert werden.

pCR-TOPO-FLP (Y. Khrunyk, MPI Marburg)

Dieses Plasmid enthält das für die Verwendung in *U. maydis* kodon-optimierte Flipase-Gen, das ursprünglich aus *S. cerevisiae* isoliert wurde.

p123-Pstp1-stp1FLP (diese Arbeit)

Komplementationsplasmid für die Integration in den *ip*-Lokus von *U. maydis*. Dieses Plasmid kodiert für das Stp1-Flp-Fusionsprotein. Das entsprechende Gen steht unter der Kontrolle des endogenen Promotors  $P_{stp1}$ .

p123-Pstp1-stp1 $\Delta$ kex (diese Arbeit)

Komplementationsplasmid für die Integration in den *ip*-Lokus von *U. maydis*. Dieses Plasmid kodiert für das Stp1-Protein, in dem die drei Kex2-Schnittstellen (As40; As371 und As390) mutagenisiert wurden, so dass sie nicht mehr von der Kex2-Protease erkannt werden. Das entsprechende Gen steht unter der Kontrolle des endogenen Promotors  $P_{stp1}$ .

p123-Pstp1-stp1 $\Delta$ cys (diese Arbeit)

Komplementationsplasmid für die Integration in den *cbx*-Lokus von *U. maydis*. Dieses Plasmid kodiert für das Stp1-Protein, in dem die zwei Cysteine ( $C^{125}$ ,  $C^{460}$ ) durch Alanin-Reste ersetzt. Das entsprechende Gen steht unter der Kontrolle des endogenen Promotors  $P_{stp1}$ .

### 4.3.8.3 Plasmide zur transienten Transformation von *N. benthamiana*

Bei allen für die transiente Proteinexpression in Tabak verwendeten Plasmide handelt es sich um pGreenII-Derivate (Hellens *et al.*, 2000a/b). Diese enthalten eine Kan-Resistenz für die Selektion in *E. coli* und *A. tumefaciens*. Es wurden diverse pGreenII-Derivate hergestellt, welche verschiedene Gene sowie ein Set verschiedener *stp1* Fragmente tragen.

#### pGreenII-YFP (Hellens *et al.*, 2000b)

Das Plasmid pGreenII-YFP wurde freundlicherweise von Dr. A. Djamei (MPI Marburg) zur Verfügung gestellt. In diesem Plasmid sind Ti-Sequenzen vorhanden, die einen Transfer von *A. tumefaciens* in Wirtspflanzen, wie beispielsweise *N. benthamiana* ermöglichen. Alle Gene oder Genabschnitte, die in pGreenII gebracht wurden, wurden in die Restriktionsschnittstellen *Bsp*HI und *Not*I inseriert. Am 3'-Ende kam es dabei zu einer „in frame“ Fusion mit dem *yfp* Gen.

#### pGreenII-CFP (Hellens *et al.*, 2000b)

Das Plasmid pGreenII wurde freundlicherweise von Dr. A. Djamei (MPI Marburg) zur Verfügung gestellt. In diesem Plasmid sind Ti-Sequenzen vorhanden, die einen DNA-Transfer von *A. tumefaciens* in Wirtspflanzen, wie beispielsweise *N. benthamiana* ermöglichen. Alle Gene oder Genabschnitte, die in pGreenII gebracht wurden, wurden in die Restriktionsschnittstellen *Bsp*HI und *Not*I inseriert. Am 3'-Ende kam es dabei zu einer „in frame“ Fusion mit dem *cfp* Gen.

#### pGreenII-Stp1-YFP (diese Arbeit)

Dieses Plasmid entstand, indem in das Ursprungsplasmid pGreenII-YFP das vollständige *stp1*-Gen eingebracht wurde.

#### pGreenII-Stp1ΔN-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII-YFP eine trunkierte Sequenz für *stp1* eingebracht, wobei die ersten 84 Basenpaare deletiert wurden. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1Δ1-28 (Stp1 ohne Signalpeptid).

#### pGreenII-Stp1ΔNΔ371-515-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII eine trunkierte Sequenz für *stp1* eingebracht, wobei die Basenpaare 1113-1545 deletiert wurden. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1Δ371-515, bei dem 144 Aminosäuren vom C-Terminus des Proteins entfernt wurden.

#### pGreenII-Stp1ΔNΔ390-515-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII eine trunkierte

Sequenz für *stp1* eingebracht, wobei die Basenpaare 1113-1545 deletiert wurden. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1Δ390-515, bei dem 125 Aminosäuren des C-Terminus des Proteins entfernt wurden.

#### pGreenII-Stp1ΔNΔ40-390-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII eine Sequenz für *stp1* eingebracht, die eine interne Deletion der Basenpaare 120-1170 enthält. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1Δ40-390, bei dem der gesamte zentrale Bereich des Protein deletiert wurde.

#### pGreenII-Stp1ΔNΔ136-339-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII eine Sequenz für *stp1* eingebracht, die lediglich die Basenpaare 408-1017 enthält. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1ΔN\_136-339, bei dem die Glycin-reiche Region des Proteins vollständig exprimiert wurde, jedoch keine N- und C-terminalen Bereiche enthält.

#### pGreenII-Stp1ΔNΔ136-515-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII eine Sequenz eingebracht, welche den 5' Bereich des *stp1* Gens darstellt. Daraus ergibt sich eine starke Verkürzung des *stp1* Gens unter Deletion der Basenpaare 408-1545. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1ΔNΔ136-515, bei dem der gesamte zentrale Bereich des Proteins deletiert wurde.

#### pGreenII-Stp1ΔNΔ339-515-YFP (diese Arbeit)

Für die Konstruktion dieses Plasmides wurde in das Ursprungsplasmid pGreenII eine Sequenz eingebracht, welche den 5'-terminalen sowie den zentralen Bereich des *stp1* Gens darstellt. Daraus ergibt sich eine starke Verkürzung des *stp1* Gens unter Deletion der Basenpaare 1017-1545. Dementsprechend kodiert dieses Konstrukt für Stp1ΔNΔ339-515, bei dem der gesamte zentrale Bereich des Proteins deletiert wurde.

### 4.1.9.4 Plasmide zur Expression von Genen in *P. pastoris*

#### pPichia-alpha-stp1 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid enthält das *stp1* Gen ohne Signalsequenz mit einer 5' fusionierten Sequenz, die für das alpha-Sekretionssignal aus *P. pastoris* kodiert. Dieses soll der Sekretion des Proteins in das Kulturmedium dienen. Die *stp1* Expression steht unter der Kontrolle eines Methanol-induzierbaren Promotors.

#### pPichia-secstp1 (diese Arbeit)

Dieses Plasmid enthält das *stp1* Gen unter der Kontrolle eines Methanol-induzierbaren *P. pastoris*-Promotors.

#### 4.1.9.5 Plasmide zur Verwendung in *S. cerevisiae*

##### 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 verschiedenen im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu testende Gene verwendet (Köderplasmid). Das Plasmid vermittelt eine Kan-Resistenz und enthält außerdem den *TRP1* Auxotrophiemarker.

##### 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 verschiedenen im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Beutegene). Das Plasmid enthält den *LEU2* Auxotrophiemarker. Das Plasmid vermittelt eine Kan-Resistenz.

##### pGBKT7-LAM (Clontech, Saint-Germain-en-Laye/Frankreich)

Kontrollvektor für das Hefe-Zwei-Hybrid-System, der das *lamin C*-Gen kodiert. Das Plasmid vermittelt eine Kan-Resistenz.

##### pGADT7mod (Djamei, A., pers. Mitteilung)

Dieses Plasmid entspricht im Wesentlichen dem Originalplasmid pGADT7, wurde jedoch in der MCS durch eine *NcoI* und eine *NotI* Schnittstelle erweitert. Das Plasmid vermittelt eine Kan-Resistenz.

##### pAD-424 (Stratagene, LaJolla/USA)

Dieses Plasmid diente als Vektor für die Generierung der cDNA Bibliothek, die für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen (vgl. 4.8) eingesetzt wurde. Das Plasmid dient der Fusion von cDNA-Fragmenten an die Gal4-Aktivierungsdomäne.

##### pGBKT7-Stp1ΔN (diese Arbeit)

Das Plasmid wurde durch Insertion des *stp1* ORFs in den Leervektor pGBKT7 (Clontech) hergestellt. Das Plasmid vermittelt eine Kan-Resistenz.

##### pGADT7-Stp1ΔN (diese Arbeit)

Das Plasmid wurde durch Amplifikation des *Stp1* ORFs ohne die für das N-terminale Signalpeptid kodierende Sequenz in den in der MCS leicht modifizierten Leervektor pGADT7 (A. Djamei, mündl. Mitteilung) eingebracht wurde.

##### pADSip10

Das Plasmid wurde durch Insertion des *sip10* ORFs über die Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in den in den Vektor pAD-424 gewonnen.

##### pAD-Sip12

Das Plasmid wurde durch Insertion des im Zwei-Hybrid System identifizierten *sip12* Fragments über die Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in den in den Vektor pAD-424 gewonnen.

##### pGADT7-Sip29

Das Plasmid wurde durch Insertion des des im Zwei-Hybrid System identifizierten *sip29* Fragments über die Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in den in den Vektor pAD-424 gewonnen.

##### pGADT7-Sip31

Das Plasmid wurde durch Insertion des des im Zwei-Hybrid System identifizierten *sip31* Fragments über die Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI* in den in den Vektor pAD-424 gewonnen.

##### pB563 (AG Mösch, Philipps-Universität Marburg)

Dieses Hefepiasmid enthält einen CEN6-ARS4 Replikationsursprung und den *LEU2* Auxotrophiemarker. Die MCS ist so angelegt, dass einfach Fusionen mit dem Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotor hergestellt werden können. Durch Glukose als Kohlenstoffquelle wird dieser Promotor reprimiert.

##### pB563-stp1ΔN (diese Arbeit)

*stp1Δn* wurde in den Vektor pB563 eingebracht, so dass das Gen unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors steht. Der Vektor enthält den *LEU2* Auxotrophiemarker.

##### pBax (R. Hückelhofen, Freising)

Dieses Hefepiasmid enthält einen CEN6-ARS Replikationsursprung und den *URA3* Auxotrophiemarker. Das *bax* Gen steht unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren *CYC-GAL*-Hybridpromotors. Durch Glukose als Kohlenstoffquelle wird dieser Promotor reprimiert.

##### pBclxl (R. Hückelhofen, Freising)

Dieses Hefepiasmid enthält einen CEN6-ARS Replikationsursprung und den *LEU2* Auxotrophiemarker. Das *bclxl* Gen steht unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *CYC-GAL*-Hybridpromotors. Durch Glukose als Kohlenstoffquelle wird dieser Promotor reprimiert.

##### p316 (R. Hückelhofen, Freising)

Kontrollplasmid für das Apoptose-Inhibitionsversuch (Ursprungsplasmid für pBax). Vermittelt *URA3* Auxotrophie.

##### p315 (R. Hückelhofen, Freising)

Kontrollplasmid für das Apoptose-Inhibitionsversuch (Ursprungsplasmid für pBclxl). Vermittelt *LEU2* Auxotrophie.

## 4.4 Mikrobiologische Standardmethoden

### 4.4.1 *E. coli* und *A. tumefaciens*

#### 4.4.1.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub>  $\approx$  0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50  $\mu$ l mit bis zu 10  $\mu$ l Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800  $\mu$ l dYT-Medium versetzt und 30-60 min bei 800 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven dYT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

#### 4.4.1.2 Transformation durch Elektroporation

Die Transformation durch Elektroporation wurde für *E. coli* sowie für *A. tumefaciens* verwendet. Eine frische Übernachtskultur wurde dazu 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei entsprechender Temperatur und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600nm</sub>  $\approx$  0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 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 elektrokompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40  $\mu$ l Zellsuspension wurden mit bis zu 5  $\mu$ l 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 ausgelöst (25 mF; 200 W; 2,5 kV für *E. coli*; 1,6 kV für *A. tumefaciens*). 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.

#### 4.4.1.3 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  $\beta$ -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.

#### 4.4.2 *U. maydis*, *S. cerevisiae* und *P. pastoris*

##### 4.4.2.1 Transformation von *U. maydis*

*U. maydis* wurde nach einem nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992) modifizierten Protokoll transformiert. Von einer frischen Plattenkultur wurde eine Yeps<sub>light</sub>-Starterkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem Yeps<sub>light</sub>-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal OD<sub>600nm</sub> = 1,0) geschüttelt. Zur Ernte wurden die Zellen bei 3200 Upm (10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) zentrifugiert, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die so gestartete Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nachdem etwa 50-70% der Zellen anprotoplastiert waren (5-15 min), wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten wurden direkt transformiert oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt. Zur integrativen Transformation wurden 70  $\mu$ l Protoplasten mit max. 10  $\mu$ l linearisierter DNA (bis zu 5  $\mu$ g) und 1  $\mu$ l Heparin-Lösung (10 mg/ml) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit 12 ml Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen, die das entsprechende 2x konzentrierte Antibiotikum in 12 ml Bottom-Agar enthält. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Southern-Blot Analyse verifiziert.

SCS-Lösung	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
STC-Lösung	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert
STC/PEG-Lösung	15 ml STC 10 g PEG4000
Regenerations-Agar (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	Top: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar 1 M Sorbitol in Yeps <sub>light</sub> Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

#### 4.4.2.2 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.

#### 4.4.2.3 Transformation von *P. pastoris*

*P. pastoris* Stämme wurden mit der Elektroporationsmethode, wie in „EasySelect Pichia Expression Kit“ Anleitung ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselect\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf)) beschrieben, transformiert.

### 4.5 Molekularbiologische Methoden

#### 4.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Plasmid-DNA, die später für Sequenzierungen verwendet werden sollte, wurde mit Hilfe des QIAprep Mini Plasmid Prep Kits nach Herstellerangaben isoliert. Für andere Anwendungen, wie Restriktionsanalysen, wurde Plasmid-DNA nach dem Prinzip der kochenden Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) Protokoll extrahiert. Dazu wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 35 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren, welche jedoch relativ unsauber im Bezug auf Proteinverunreinigungen ist.

STET-Puffer	50 mM Tris-Cl, pH 8,0 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 8% (w/v) Saccharose 5% (v/v) Triton X-100 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA*2H <sub>2</sub> O

##### 4.5.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe wurde der entsprechende Stamm in selektivem SD-Medium aerob bei 28°C angezogen. 2 ml der Kultur wurden in einem Eppendorfgefäß geerntet und in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer (vgl. 4.5.1.3) resuspendiert. Nach der Zugabe von 400 µl TE-Phenol/Chloroform (vgl. 4.5.1.3) und etwa 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) gemixt. Nach einem 5-minütigem Zentrifugationsschritt (13000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Chloroform vermischt. Nach erneutem 10 minütigem Mixen im Vibrax wurden die Proben für 5 min zentrifugiert (13000 Upm, RT). Die obere Phase

wurde danach wiederum in ein neues Gefäß überführt, mit 750 µl 100% Ethanol versetzt und für 20 min (13000 Upm, RT) zentrifugiert. Das resultierende DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert.

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

Diese Methode wurde nach Hoffman und Winston (1987) modifiziert. 1,5 ml einer Übernachtskultur in Yeps<sub>Light</sub>-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 20 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt. Nach 20-30-minütiger Zentrifugation zur Phasentrennung (14.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol *p.a.* gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 2 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 g/ml RNase A aufgenommen, bei 55°C für 15 min resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

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

#### 4.5.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus *Z. Mays*

Genomische DNA wurde mittels des RedExtract PCR Kits (Sigma-Aldrich, Dürheim) bzw. mittels des PlantExtrakt DNA Isolation Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

#### 4.5.1.5 Test auf filamentöses Wachstum

*U. maydis* Stämme wurden in Yeps<sub>light</sub> Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von etwa 0,8 aerob inkubiert (28°C). Die Zellen wurden geerntet (3500 upm; RT; 5 min; Heraeus Variofuge 3.0R) und das Pellet anschließend in sterilem Wasser so aufgenommen, dass eine OD<sub>600nm</sub> von 1 eingestellt wurde. 6 µl jeder Suspension wurden auf Aktivkohle-haltige PD-Platten getropft. Nach dem Eintrocknen wurde die Platte mit Parafilm versiegelt und für 24 h bei 28°C inkubiert. Filamentöses Wachstum war anhand der Bildung eines weißen Luftmyzels erkennbar.

### 4.5.2 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

#### 4.5.2.1 Restriktionen

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II-Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt) für 1-12 h bei Enzym-spezifischer Temperatur durchgeführt. Die restringierte DNA wurde später auf Agarosegelen analysiert. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 – 2 µg reine DNA  
2 µl enzymespezifischer 10 x NEB-Puffer 1-4  
ggf. 2 µl 10x BSA  
0,5 U Restriktionsendonuklease  
ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.5.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem Insert verbunden werden sollte, wurde



die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. In Ligationen, bei denen zwei Flanken mit einer Restriktionskassette (für *U. maydis* Deletionskonstrukte) gekoppelt werden sollten, wurden die Flankenfragmente in einem molaren Verhältnis von 2:1 gegenüber der Resistenzkassetten-DNA eingesetzt. Die Ligationen wurden für mindestens eine halbe Stunde (RT) oder über Nacht (16°C) durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

n mol Vektor oder Resistenzkassetten-DNA  
 5 x n mol bzw 2 x n mol Insert oder Flanken-DNA  
 2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer  
 400 U T4-DNA-Ligase  
 ad 20 µl mit dH<sub>2</sub>O

#### 4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration 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 nun in flüssigem Zustand in eine Gelform gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dies in eine dafür vorgesehene 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 langsam (in Abhängigkeit von Größe und Agarosekonzentration) in Richtung Anode. Sichtbar gemacht wurde die DNA durch UV-Bestrahlung bei 254 nm. 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 ansetzen und sterilfiltrieren

#### 4.5.4 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren (z. B. PCR- oder Restriktionsansätze) wurden mit dem Kit „Wizard SV Gel and PCR Purification System“ (Promega, Mannheim) aus Agarosegelfragmenten nach Herstellerangaben eluiert bzw. aufgereinigt.

#### 4.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Diese sind mit den entsprechenden typischen Ansätzen im Folgenden beschrieben. Dazu werden die im Ansatz enthaltenden Komponenten angegeben. Außerdem wird das PCR Programm, vereinfacht nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung/Dauer – [Denaturierung – Anlagerung – Elongation] x Zahl der Zyklen – finale Elongation dargestellt. Die Elongationszeiten wurden je

nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit des verwendeten Enzyms variiert. Die Anlagerungstemperaturen wurden *in silico* mittels des Programmes Clonemanager 9 (Sci-Ed Software, Cary/USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine PTC-200 (Peletier Thermal Cycler, MJ Research) durchgeführt.

**PCR-Ansatz mit Phusion-Polymerase** (Standardpolymerase bis ca. 6 kb; Finnzymes/NEB, Frankfurt)

Ansatz           ca. 50 µg Matrizen-DNA  
                   200 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)  
                   1 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)  
                   1 µM Primer 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 Extreme Polymerase** (inverse PCR; Novozym/Merck, Darmstadt)

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

**PCR-Ansatz mit RedMix** (Kolonie-PCR/Screens im großen Maßstab; Bioline, Luckenwalde)

Ansatz           1 x konzentrierter RedMix  
                   1,25 µM Primer 1 (bindet am 5' Strang)  
                   1,25 µM Primer 2 (bindet am 3' Strang)  
                   1 µl Zellkultur bzw. 1 Kolonie (Pilze oder Bakterien)  
 Programm:    94°C/2 min – [94°C/30 s – 50-65°C/20 s – 72°C/30 s/kb] x 30-40 – 72°C/10 min

#### 4.5.6 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren

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

#### 4.5.7 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Plasmide, die die zu sequenzierenden Fragmente enthielten, wurden mittels des Kits „Plasmid Prep QiaPrep Plasmid Prep Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt. Pro Sequenzierreaktion wurde 1 µg Plasmid zur externen Sequenzierung an die Abteilung „ADIS“ des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung in Köln gesendet. Alternativ wurde die Sequenzierungsreaktion selbst durchgeführt, gereinigt und intern in der AG Sogaard-Andersen, MPI Marburg analysiert. Ein Reaktionsansatz enthielt 1% BigDye Terminator 3.1 Cycle Mix (Applied Biosystems), 15% 5x Sequenzierungspuffer (Applied Biosystems), ca. 400 ng DNA und den Primer in einer Endkonzentration von 0,25 µM in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das Programm umfasste für Primer mit einer Schmelztemperatur

>60°C folgende Zyklen: 96°C/1 min - [96°C/10 s - 60°C/4 min]x 25. Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger (1977) durchgeführt.

#### 4.5.8 Analyse von gDNA Modifikationen mittels Southernblot

Diese Methode wurde modifiziert nach Southern (1975) durchgeführt. Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Vor dem Transfer wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung schüttelnd inkubiert, um auch den Transfer großer DNA-Fragmente zu ermöglichen. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH neutralisiert. Der Transfer erfolgte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens 4 h.

##### 4.5.8.1 Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA über DIG-Markierung

Für den Nachweis von immobilisierter DNA über DIG-Markierung wurden vorwiegend mittels PCR hergestellte DNA-Fragmente mittels DIG High Prime (Roche) gemäß Herstellerprotokolls markiert. Teilweise wurden die DNA-Sonden auch während der PCR mittels des PCR DIG Labelling Mix (Roche) wiederum nach Herstellerangaben hergestellt. Die so synthetisierten Sonden wurden für 10 min bei 99°C denaturiert und zu 30 ml auf 65°C vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben. Nach halbstündiger Vorhybridisierung der Membran mit Southern-Hybridisierungspuffer bei 65°C (Hybaid Shake'n'Stack, Thermo Electron Corporation) in einer Hybridisierungsröhre wurde der Puffer entfernt und die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, Hitze-denaturierte Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens sechs Stunden drehend im Hybridisierungsöfen 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) 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).

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

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

#### 4.5.9 Isolierung von RNA

##### 4.5.9.1 Gewinnung von RNA aus axenischer *U. maydis* Kultur

2 ml *U. maydis* Kulturen mit einer OD<sub>600nm</sub> von 1 wurden geerntet, mit 0,3 g Glaskugeln (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versehen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das gefrorene Zellpellet wurde in 600 µl AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 30 s kräftig geschüttelt (Vibrax, IKA, Staufen). Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C und 1400 Upm (Eppendorf Thermomixer) für vier Minuten. Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Es folgte ein Extraktionsschritt mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung wurde daraufhin mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h, -20°C). Nach erneuter Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C) wurde die RNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND\_1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific/Fisher Scientific, Schwerte).

##### 4.5.9.2 Gewinnung von RNA aus *U. maydis* Zellen von Maisblattoberflächen infizierter Pflanzen

Um spezifisch RNA aus *U. maydis* Zellen zu gewinnen, die auf der Oberfläche von Maispflanzen lokalisieren, wurden die zu beprobenden Blätter (i.d.R. das dritte Blatt von nach sieben Tagen mit *U. maydis* infizierten Pflanzen) mittels doppelseitigem Klebeband fixiert. Die Oberfläche der infizierten Blätter wurde anschließend dünn mit flüssigem Latex bestrichen. Nach dem Trocknen des Latex wurde dieses vorsichtig von der Oberfläche entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Latexstücke wurden daraufhin unter flüssigem Stickstoff gemörsert und die enthaltene RNA mittels Trizol-Präparation (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben extrahiert. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND\_1000 Spektrophotometer.

##### 4.5.9.3 Gewinnung von RNA aus infiziertem Maisgewebe

Für die Extraktion von RNA aus mit *U. maydis* infiziertem Maisgewebe wurden infizierte Bereiche des 3. Blattes unterhalb der Einstichlöcher geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattstückchen wurden anschließend zerkleinert, in Eppendorf-Gefäße überführt und mit einem Eppendorf-Mörser unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert. RNA wurde dann aus dem Pulver mittels der Trizol-Extraktionsmethode (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben präpariert. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND\_1000 Spektrophotometer.

#### 4.5.10 Quantitative Real-Time PCR

Für quantitative Real-Time PCR (Q-PCR) wurde RNA mittels Trizol-Präparation (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben extrahiert. DNA Reste in den RNA-Proben wurden mittels des „Turbo DNA-free“ Kits (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt und die RNA

daraufhin in cDNA revers transkribiert („SuperskriptIII First Strand Synthesis SuperMix“; Invitrogen, Karlsruhe). Die cDNA wurde für Q-PCR Reaktionen eingesetzt, die mit Hilfe des „Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG“ Kits von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Für die PCR Reaktionen wurden in der Regel 1-5 µl cDNA eingesetzt. Als Referenzfarbstoff wurde Fluorescein (20 nM; Bio-Rad, München) eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem Bio-Rad iCycler-System unter der Verwendung des Programmes 95°C/2 min – [95°C/30 s – 62°C/30 s – 72°C/30 s] x 45 durchgeführt. Die Spezifität der Reaktionen wurde nach Beenden der PCR anhand der vom Gerät berechneten Schmelzkurve überprüft. Der „Threshold Cycle“ wurde mittels der Bio-Rad Software Version 3.0 ermittelt. Die relativen Expressionwerte wurden mit Hilfe des Programmes *Gene Expression Macro* (Bio-Rad, München) berechnet.

#### 4.6 Mais-Transkriptomanalysen durch Affymetrix-Microarrays

Diese Methode wurde bereits in Doehlemann *et al.* (2008) beschrieben. Für die Mikroarray-Analysen wurden die Maispflanzen einzeln in Erde des Typus „P“ gesät (<http://www.hawita.de>). Nach sechs Tagen wurden die Pflanzen in eine Phytokammer (Vötsch, Balingen-Frommern) überführt, wo einen Tag später die Infektion mit SG200Δstp1 (OD<sub>600nm</sub> von 3) durchgeführt wurde. In der Phytokammer herrschte ein 15 h/9 h Licht-Dunkel-Zyklus. Die Temperatur betrug 28°C während der Tag-Phase und 20°C während der Nacht-Phase, wobei die Luftfeuchtigkeit während dieser Phasen 40% bzw. 60% betrug. Diese Änderungen wurden innerhalb einer Stunde eingestellt („ramping“). Microarray-Pflanzen wurden für 12 h-Werte zu Beginn der Tag-Periode infiziert, wohingegen Pflanzen für 24 h-Werte etwa 1 h vor Ende der Tag-Periode inokuliert wurden (Brachmann *et al.*, 2001). Zur Ernte wurde jeweils das dritte Blatt der Pflanzen entfernt und ein etwa 2 cm langes Stück unterhalb der Infektionseinstichlöcher geerntet und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden Proben aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten gewonnen. Ein biologisches Replikat bestand dabei aus 30 Pflanzenproben, die für die RNA-Isolierung zusammengeführt und nach gründlichem Mörsern unter flüssigem Stickstoff gut durchmischt wurden. Die RNA-Extraktion wurde mit der Trizol-Methode (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt und die Proben später mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Qualitäts- und Quantitätskontrollen erfolgten durch photometrische Messung am NanoDrop ND\_1000 Spektrophotometer, sowie durch Analysen mittels eines Agilent 2100-Bioanalyser nach Herstellerangaben.

Die Affimetrix-Microarrays wurden nach den standardisierten Herstellerprotokollen für die Hybridisierung von Mais Genomarrays nach dem „Midi\_EuK2V3“ Protokoll mit Hilfe einer GeneChip Fluidics Station 400 durchgeführt. Der Scan erfolgte mit einem Affymetrix GSC3000 Scanner. Die Analyse der gewonnenen Transkriptomdaten wurde mittels Affymetrix GCOS1 1.4 und dChip1.3 (<http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>) durchgeführt. Ein „fold change“ von >2 mit einer Differenz in der Genexpression von >100 und einem korrigierten p-Wert von <0,001 wurde dabei als signifikant betrachtet.

#### 4.7 Proteinbiochemische Methoden

##### 4.7.1 Antikörper

###### 4.7.1.1 Kommerziell erworbene Antikörper

In dieser Arbeit wurden diverse Antikörper in Western Blot-Analysen und Immundetektionen eingesetzt, die in Tabelle 13 zusammengefasst sind.

**Tabelle 13: Verwendete Antikörper mit eingesetzter Verdünnung und Herstellerangaben.**

Antikörper	Verwendung	Bezug
Maus anti-HA	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente (1:10000 Verdünnung)	Sigma (Deisenhofen)

Maus anti-GFP	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von GFP- sowie YFP- und CFP-Fusionsproteinen verwendet wurde (1:5000 Verdünnung)	Roche (Mannheim)
Gans anti-Kaninchen IgG	Sekundärer Antikörper zur Detektion primären Antikörpern, die aus Kaninchen gewonnen wurden (1:10000 Verdünnung)	CST/NEB–HRP von (Frankfurt a. M.)
Pferd anti-Maus IgG-HRP	Sekundärer Antikörper zur Detektion primären Antikörpern, die aus Mäusen gewonnen wurden (1:10000 Verdünnung)	CST/NEB von (Frankfurt a. M.)
Maus anti-BD	Primärer Antikörper, der zur Detektion von Proteinen fusioniert mit der Gal4-Bindedomäne genutzt wurde (1:3300 Verdünnung)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Kaninchen anti-AD	Primärer Antikörper, der zur Detektion von Proteinen, fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne genutzt wurde (1:3300 Verdünnung)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-Mouse AF488	Sekundärer, fluorophor-gekoppelter Antikörper, welcher in <i>in situ</i> Immunlokalisierungen eingesetzt wurde (1:2000 Verdünnung)	Invitrogen (Karlsruhe)
Maus anti-Tubulin	Monoklonaler primärer Antikörper für die <i>in situ</i> Immunlokalisierung von Tubulin (1:5000)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)

#### 4.7.1.2 Gewinnung von Stp1-spezifischen polyklonalen Antikörpern

Für die Generierung von Stp1-spezifischen Antikörpern wurde insgesamt 1 mg gereinigtes Stp1 $\Delta$ N Protein (siehe 4.7.15/4.7.16) auf SDS-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Nach Commassie-Blaufärbung wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zu Eurogentech (Liege/Belgien) geschickt. Dort wurden zwei Kaninchen mit je 4 x 100  $\mu$ g Stp1 $\Delta$ N -Protein nach dem Standard 87-Tage-Programm immunisiert. Der Antikörper zeigt starke Kreuzreaktionen mit Maisproteinen, zeigt jedoch eine sehr gute Qualität ohne Kreuzreaktionen in Hefe, *E. coli* und *U. maydis* Extrakten.

#### 4.7.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus *U. maydis*

##### 4.7.2.1 Gewinnung von denaturierten SG200 Proteinextrakten

Proteinextrakte wurden nach einer von A. Straube (2004) beschriebenen, leicht modifizierten Methode gewonnen. Dazu wurde eine *U. maydis* Kultur bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 geerntet, mit 0,3 mg Glasperlen versetzt und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Pellet wurde dann in IP2-Puffer resuspendiert (50  $\mu$ l/ml Kultur) und für 10 min bei 99°C gekocht. Anschließend wurden Zelltrümmer bei 13000 upm für 10 min pelletiert und der Überstand (löslicher Proteinextrakt) in ein neues Gefäß überführt.

IP2-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 1% (w/v) NP40
------------	---

0,01% (w/v) NaN<sub>3</sub>  
 1 Tablette/25 ml Complete EDTA-free (Roche)  
 1 mM PMSF

#### 4.7.2.2 Gewinnung von denaturierten Proteinextrakten aus AB33 Filamenten

Filamente wurden in IP2 Puffer (s. 4.7.2.1) oder einem anderen geeigneten Proteinpuffer (z.B. 1x PBS mit Protease-Inhibitoren oder direkt in SDS-Probenpuffer) resuspendiert, stark gevortext um eine gute Durchmischung zu bewirken und für 10 min bei 99°C gekocht (Eppendorf Thermocycler, 1400 Upm). Es folgte ein 1-minütiger Aufschluss mittels eines FastPrep-24 Homogenisators (6,5 m/s; MP Biomedicals, Heidelberg). Nachfolgend wurde die Suspension erneut für 10 min bei 99°C gekocht. Aliquots wurden daraufhin mit 6 x SDS-Gelladepuffer versetzt (s. 4.7.12) und für die SDS-PAGE Analyse eingesetzt.

#### 4.7.3 Proteinisolation aus *U. maydis* Kulturüberständen

Für die Analyse von *U. maydis* Kulturüberständen wurden entsprechende *U. maydis* Stämme über Nacht in 5 ml Kulturen angezogen. Die Kulturen wurden danach auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 verdünnt und bei 28°C aerob inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3-0,4 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3500 Upm (SG200 und Derivate) bzw. 8000 Upm (AB33 und Derivate) vom Kulturüberstand getrennt (Heraeus Varifuge 3.0R). Nicht vollständig pelletierte Filamente aus Kulturüberständen induzierter AB33 Zellen wurden zusätzlich durch Filtration (Cellulose-Filter, 615 ¼ MN; Macherey-Nagel/MAGV, Rabenau-Londorf) beseitigt. Kulturüberstände wurden durch TCA-Präzipitation (s. 4.7.8) stark ankonzentriert. Sowohl die Zellfraktion als auch der angereicherte Überstand wurden für die Western Blot-Analyse mit SDS-Gelladepuffer (s. 4.7.12) versetzt und für 10 min bei 99°C gekocht.

#### 4.7.4 Induktion von filamentösem Wachstum in AB33

Filamente wurden in AB33 und dessen Derivaten mittels der in Brachmann (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Stämme über Nacht in AM-Glk Medium angezogen, am Morgen auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen und in identischem Volumen AM-Glk Medium resuspendiert. Die Induktion wurde für mindestens sechs Stunden unter aerober Inkubation bei 28°C durchgeführt. Die Filamentinduktion wurde mittels Lichtmikroskopie überprüft.

#### 4.7.5 Gewinnung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Für die Gewinnung von Proteinextrakten aus Hefekulturen in kleinem Massstab wurden 5 ml Kulturen in entsprechendem Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1 angezogen. Nach der Ernte der Zellen wurden die Pellets sofort in 1 ml 1 x PBS mit 1 mM PMSF resuspendiert und für 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 µl ESB-Puffer resuspendiert und für 3 min bei 95°C inkubiert. Die Suspension wurde mit 0,3 mg Glassperlen versetzt und anschließend 2 min auf einem Vibrax bei 1200 Upm geschüttelt. Dann wurden nochmal 70 µl ESB-Puffer zugegeben, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation bei 95°C. Der Überstand der Suspension wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

ESB-Puffer	2% (w/v) SDS
	80 mM Tris/HCl, pH 8,0
	10% (v/v) Glycerin
	1,5% (w/v) DTT <sub>red</sub>
	0,1 mg/ml Bromphenolblau

#### 4.7.6 Gewinnung von Proteinextrakten aus *Z. mays*

Für die Herstellung von Proteinextrakt wurden Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam mit Wildtyp- und Deletionsstämmen infiziert. 3-5 Tage nach Infektion wurden infizierte Pflanzenteile geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzengewebe wurde zerkleinert und in flüssigem Stickstoff sorgfältig zu einem feinen Pulver gemörsert. Mörser und Pistill wurden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das gefrorene Pflanzenpulver wurde in 1 ml Portionen in 2 ml Eppendorf-Cups überführt und das gefrorene Material anschließend auf Eis angetaut. Das angetaute Material wurde mit Extraktionspuffer auf 2 ml aufgefüllt und Zelltrümmer für 30 min bei 4°C und 13000 Upm in der Tischzentrifuge pelletiert. Der „Cola-farbene“ Überstand wurde durch ein Cellulose-Filter (615¼ MN; Macherey-Nagel/MAGV, Rabenau-Londorf) von verbliebenem unlöslichem Material befreit und für weitere Anwendungen wie etwa die Anti-HA Immunpräzipitation genutzt (vgl. 4.7.9).

Extraktionspuffer (modifiziert nach Sheen, 1996)	100 mM Mops, pH 7,5 10 mM MgCl <sub>2</sub> 0,5 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 2 mM DTT <sub>red</sub> * 20 mM NaF (Phosphatase-Inhibitor) 0,3% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail for Plants (Roche, Mannheim) 0,3% (v/v) Pefabloc (100 mg/ml; Sigma-Aldrich) 0,1 g/g Frischgewicht PVPP *nicht eingesetzt in HA-Immunpräzipitationen
--	--

#### 4.7.7 Gewinnung von Proteinextrakten aus *N. benthamiana*

Protein-Rohextrakte aus transformierten *N. benthamiana* Blättern wurden mittels Harnstoff-Extraktion gewonnen. Hierzu wurden mit einem Korkbohrer (0,9 cm Durchmesser) je 2 Blattscheiben pro infiziertem Blattareal ausgestanzt und in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß in flüssigem Stickstoff mittels Eppimörsern zerkleinert. Das entstandene Pulver wurde mit 120 µl 8 M Harnstoff und 30 µl 5 x SDS-Gelladepuffer (mit β-Mercaptoethanol) versetzt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die gefrorenen Proben wurden anschließend für 10 min bei 99°C gekocht und nochmal tiefgefroren. Für die SDS-PAGE-Analyse wurden die Proben aufgetaut und für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert (RT). Der entstehende Überstand wurde für weitere Analysen verwendet.

#### 4.7.8 Trichloracetat-Präzipitation von Proteinen

Für die Trichloracetat-Fällung (TCA-Fällung) von Proteinen wurden Proteingemische mit 10% (v/v) TCA versetzt und für mindestens eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden danach bei 8000 Upm für 45 min (4°C; Heraeus Variofuge 3.0R) pelletiert, zweimal mit Aceton (-20°C) gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde bei 40°C im Thermoblock vollständig getrocknet und danach in einem entsprechenden, SDS-haltigen Puffer gelöst (z. B. SDS-Gelladepuffer; 4.7.12).

#### 4.7.9 Immunpräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe

Stp1-HA, CherryHA und Stp1-CherryHA wurden durch Immunpräzipitation aus mit den entsprechenden *U. maydis* Stämmen (SG200stp1-HA, SG200stp1(SP)mCherryHA und SG200stp1-mcherryHA) infiziertem Maisgewebe isoliert. Das „ProFound™ HA Tag IP/Co-IP





200 V. Die Proteine wandern aufgrund ihrer durch die Anlagerung von SDS negativen Ladung vom Minus- zum Pluspol.

6 x SDS-Gelladepuffer	1,5 mM Tris-HCl pH 6,8 30% (w/v) SDS 0,15% (w/v) Bromphenolblau 10% Endkonzentration Glycerin
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 4 mM SDS

#### 4.7.13 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Westernblot)

Im Westernblot wurden Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, auf eine PVDF-Membran übertragen und dort durch Immundekoration spezifisch detektiert. Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran wurde ein Semi-DryBlot durchgeführt. Die Membran muss vor der Verwendung durch kurzes Benetzen mit Methanol und anschließendes Äquilibrieren in dH<sub>2</sub>O aktiviert werden. Für den Blot wird 1 Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der PVDF-Membran bedeckt. Auf die Membran wird blasenfrei das SDS-Gel gelegt und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer wurde für 60 min bei 40 mA/Gel durchgeführt.

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

Die durch Western-Blotting auf PVDF-Membranen überführten Proteine wurden durch spezifische Antikörper detektiert. Dazu wurde die Membran mit Blockierlösung für mindestens eine Stunde inkubiert, kurz mit TBS-T gewaschen und dann für 1-12 h bei 4°C oder RT mit Antikörperlösung, die den primären Antikörper enthielt, geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit Antikörperlösung, welche den sekundären Antikörper enthielt, für eine Stunde inkubiert (RT). In dieser Arbeit wurden ausnahmslos Meerrettich-Peroxidase- (HRP; „horse raddish peroxidase“) Konjugate als sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-T wurde die Chemolumineszenz-Reaktion durchgeführt, indem die Membran für fünf Minuten mit ECL-Reagenz (GE Healthcare, München) inkubiert wurde. Die Membranen wurden dann in eine Folie überführt und in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Die Exposition des Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) erfolgte je nach Intensität des Lichtsignals für 1 bis 30 min durch Auflegung des Filmes auf die eingeschlagene Membran. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

TBS-T	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween20
Blockierlösung	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T
Antikörperlösung	Antikörper verdünnt in 3% (w/v) Milchpulver in TBS-T

#### 4.7.14 Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen und auf PVDF-Membranen

##### 4.7.14.1 Commassie-Proteinfärbung

Zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde die Commassie-Färbung (Nachweisgrenze: 200-400 ng Protein pro Bande) durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte für 30 min mittels einer Commassie-Maldi-Färbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,2% (w/v) Brilliant Blau R250). Die erste Entfernung ungebundenen Farbstoffs erfolgte durch 30-minütige Inkubation in Entfärberlösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure). Zur vollständigen Entfernung diente 10% (v/v) Essigsäure.

##### 4.7.14.2 Silberfärbung

Diese sensitive Methode wurde zum sensitiven Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen nach Blum *et al.* (1987) angewendet. Die Nachweisgrenze dieser Färbung beträgt 5 ng pro Bande.

#### 4.7.15 Heterologe Expression von Stp1ΔN in *E. coli*

Stp1ΔN wurde zur späteren Immunisierung von Kaninchen als N-terminale 6xHis-Fusionsprotein rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) Rossetta hergestellt. Eventuelle Engpässe während der Translation, die auf einer Verwendung seltener Kodons in *U. maydis* beruhen, wurden durch die Wahl des BL21-Derivats Rossetta beseitigt, der fünf seltene Kodons auf einem zusätzlichen Plasmid bereitstellt. Zur Stp1 Expression wurde das Plasmid pET15b-stp1ΔN in den entsprechenden Stamm transformiert und dieser aerob bei 37°C angezogen. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 wurden zur Induktion der genomkodierten T7-RNA-Polymerase 1,0 mM IPTG zugegeben. Da in dem Plasmid das Zielgen unter der Kontrolle des starken T7-Promotors steht, wird so die Proteinexpression induziert. Nach einer Induktionszeit von 3 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert.

Zur Analyse der Produktion und Löslichkeit des Stp1ΔN-6xHis Proteins wurden die geernteten Zellen nach Angaben des „QIAexpressionist“ Protokolls (Qiagen, Hilden) behandelt (Protokoll: „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 von Stp1ΔN hin analysiert. Aus diesem Versuch ergab sich, dass das Protein unter den getesteten Bedingungen lediglich in der unlöslichen Fraktion und nie in der löslichen, cytosolischen Fraktion zu finden war. Da das Protein in der unlöslichen Fraktion („inclusion bodies“) lokalisierte, wurde es unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (vgl. 4.7.16). Dazu wurde das Zellpellet in Lysispuffer B resuspendiert (Gesamtzellextrakt). Nach einer 60 minütigen Inkubation unter leichtem Rühren wurden Zelltrümmer (unlösliche Fraktion) vom Überstand getrennt, indem die Suspension bei 10.000 g für 30 min (RT) zentrifugiert wurde.

Lysispuffer B (denaturierend)	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
	8 M Harnstoff

#### 4.7.16 Denaturierende Reinigung von Stp1ΔN aus *E. coli*

Das in der unlöslichen Fraktion („inclusion bodies“) vorhandene, rekombinant hergestellte Stp1ΔN-Protein wurde mittels denaturierender His-tag Affinitätschromatographie nach Angaben des „QiaExpressionist“ Protokolls „Batch Purification of 6 x His (Qiagen, Hilden) gereinigt, wobei Ni-NTA Matrix (Qiagen, Hilden) eingesetzt wurde. Nach einer schwenkenden Inkubation der Matrix mit dem *E. coli* Lysat für 1 h (RT) wurde diese viermal mit achtfachem Säulenvolumen Waschpuffer C (pH 6,3) gewaschen. Das Eluieren geschah pH-abhängig in zwei Schritten. Zunächst wurde viermal mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer D (pH 5,9), dann viermal mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer E (pH 4,5) eluiert. Die unterschiedlichen

Fraktionen (Durchfluss-, Wasch- und Eluatfraktionen) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Waschpuffer C	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl, pH 6,3 8 M Harnstoff
Elutionspuffer D	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl, pH 5,9 8 M Harnstoff
Elutionspuffer E	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl, pH 4,5 8 M Harnstoff

#### 4.7.18 Heterologe Expression von Stp1 in *P. pastoris*

Für die heterologe Expression von Stp1 in *P. pastoris* wurden die Plasmide pPichia-alpha-stp1 und pPichia-secstp1 durch Elektroporation jeweils in die *P. pastoris* Stämme X33 (Wildtyp Stamm; Mut<sup>+</sup>) und GS115 (Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>; beide Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Die Induktion der Proteinexpression und spätere Analyse des Kulturüberstandes erfolgte nach den Angaben im „EasySelect Pichia Expression Kit“ Handbuch (Invitrogen).

#### 4.7.18 Massenspektrometrische Analysen

Die Analyse von einzelnen Proteinbanden aus SDS-Gelen wurde freundlicherweise von Jörg Kant (MPI Marburg) mittels MALDI-MS übernommen und wurde für die Verifizierung der Stp1 Proteinreinigung angewendet.

#### 4.8 Analyse von Proteininteraktionen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde zur Identifizierung von bislang unbekanntem Stp1 (Köderprotein/*Bait*)-Interaktionspartnern sowie zur Charakterisierung von Interaktionen zwischen bereits bekannten Proteinen verwendet. Protein-Protein-Interaktionen wurden unter Hochstringenzbedingungen (Selektion auf SD -Leu -Trp -His -Ura und ggf.  $\alpha$ -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. Als Bibliothek für die Suche nach Interaktionspartnern diente eine cDNA-Bank, die aus infiziertem Pflanzenmaterial (2 und 5 dpi Gemisch) gewonnen und freundlicherweise von Dr. Christoph Basse (MPI Marburg) zur Verfügung gestellt wurde (Farsing, 2003).

#### 4.9 Analyse zur Inhibition von Bax-induziertem Zelltod

Um zu testen, ob Stp1 den Bax-induzierten Zelltod im Hefesystem supprimieren kann, wurde das Plasmid pB563-stp1 $\Delta$ N zusammen mit dem Plasmid pBax in den Hefestamm YHUM0472 transformiert. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Suppression diente YHUM0472/pBax/pBclxl. Negativkontrollen waren YHUM0472/pB563-stp1 $\Delta$ N und YHUM0472/p315/p316. Als Negativkontrolle diente YHUM0472/pBax/p315. In allen genkodierenden Plasmiden konnte die Expression durch einen Mediumwechsel von Glukose- zu Galaktose als einziger Kohlenstoffquelle induziert werden.

## 4.10 Pflanzenmethoden

### 4.10.1 *Zea mays*

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

Für Infektionsversuche wurde ausschließlich die Maisvarietät Early Golden Bantam verwendet (Olds Seeds, Madison/USA).

#### 4.10.1.2 Kultivierung von *Z. mays*

Maispflanzen des Kultivars Early Golden Bantam wurden in einem Gewächshaus kultiviert. Die Nachtphase mit 20°C und 60% Luftfeuchte dauerte 9 h, die Tagphase mit 28°C und 40% Luftfeuchte 15 h, wobei 2,5 h auf die Simulation des Sonnenaufgangs und 3,5 h für die Simulation des Sonnenuntergangs entfielen („ramping“). Die Beleuchtung betrug während der Tag Phase mindestens 28000 Lux (bei zusätzlicher Sonneneinstrahlung bis zu 90000 Lux). Jeweils vier Maiskörner wurden in Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert. Eine Ausnahme bildeten nur Maispflanzen, die für Mikroarray-Analysen verwendet wurden (vgl. 4.6).

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

Die zu infizierenden Stämme wurden vorher über Nacht in Yeps<sub>light</sub>-Flüssigkultur bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6-0,8 angezogen. Dann wurde die Kultur geerntet und in sterilem Wasser resuspendiert, so dass eine OD<sub>600nm</sub> von 1,0 erreicht wurde. Bei Standard-"Spritzinfektionen" wurden 200 bis 500 µl dieser *U. maydis* Suspensionen in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam gespritzt. Die Injektionsstelle wurde etwa 1 cm über der Erde gewählt, also etwa 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei werden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen. Für Infektionen mit kompatiblen Wildtypstämmen wurden die beiden entsprechenden Suspensionen kompatibler Stämme in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.

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

Für die Quantifizierung von Pathogenitätssymptomen nach Infektionen von *Z. mays* mit *U. maydis* wurden jeweils nach 6 und 12 Tage nach Infektion die Symptome nach den folgenden Kriterien (Tabelle 14) klassifiziert. Die Pathogenität von Mutanten wurde aus in mindestens drei unabhängigen Infektionen von ungefähr 40 Pflanzen gewonnenen Werten gemittelt (vgl. Kämper *et al.*, 2006).

**Tabelle 14: Klassifizierung der Symptome von Maispflanzen nach Infektion mit *U. maydis*.**

Symptomklasse	Beschreibung des entsprechenden Phänotyps
Keine Symptome	Die Pflanze zeigt keinerlei Anzeichen einer Infektion
Chlorose	Die Pflanze zeigt gelblich-bleiche Verfärbungen an den infizierten Blättern (3. Blatt und jünger)
(Ligula-)Schwellung	Die Pflanze zeigt leichte Schwellungen an der Ligula oder an den Blättern
Kleine Tumore (< 1 mm)	Die größten Tumore auf der Pflanze sind ≤ 1 mm
Große Tumore (> 1 mm)	Die größten Tumore auf der Pflanze sind > 1 mm
Starke Tumorbildung/ Verkümmerung	Die Wachstumsachse der Pflanze krümmt sich aufgrund sehr starker Tumorbildung
Tote Pflanzen	Die Pflanze ist aufgrund der <i>U. maydis</i> Infektion eingegangen

#### 4.10.1.5 Selektion aufspaltender Maislinien durch BASTA-Behandlung

Aufspaltende Reporter-Maislinien, generiert von Dr. D. Becker (Universität Hamburg) wurden mittels Behandlung mit dem Breitspektrum-Herbizid Basta auf die Präsenz des *bar* Gens (Basta Resistenzgen) selektioniert. Dazu wurden Maispflanzen während des Zwei-Blattstadiums im Abstand von zwei bis drei Tagen zweimal mit Basta-Lösung besprüht. Überlebende Pflanzen waren resistent und konnten für weiterführende Experimente verwendet werden.

Basta-Lösung	200 mg/L BASTA (Bayer CropScience, Monheim) 0,1% (v/v) Tween20 in Leitungswasser gelöst.
--------------	--

#### 4.10.2 Tabak

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

Für die *A. tumefaciens*-vermittelte transiente Expression von Proteinen in Tabakpflanzen wurde ausschließlich die Varietät *Nicotiana benthamiana*, die freundlicherweise von der AG Batschauer (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.

##### 4.10.2.2 Kultivierung von *N. benthamiana*

Tabakpflanzen der Spezies *N. benthamiana* wurden in einem Gewächshaus wie für *Z. mays* beschrieben bei 28°C angezogen (vgl. 4.10.1.2).

##### 4.10.2.3 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<sub>600nm</sub> von 0,2 mit 125 µM Acetosyringon (Sigma-Aldrich, Weinheim) versetzt. Nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,6 wurden die Zellen geerntet und in Induktionsmedium (125 µM Acetosyringon, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES/KOH, pH 5,4) auf eine OD<sub>600nm</sub> von 1 gebracht. 3-6 Wochen alte Tabakpflanzen wurden mit einer 1 ml Plastikspritze ohne Nadel auf der Blattunterseite mit der Suspension infiltriert. Die Pflanzen wurden nach der Infektion mit einer Folie bedeckt auf der Laborbank für zwei Tage stehen gelassen (RT) und anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

#### 4.11 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen in fixiertem Pflanzengewebe

Der immunhistochemische Nachweis von Proteinen in infiziertem Maisgewebe wurde anhand des von Sauer *et al.* (2006) beschriebenen Protokolls durchgeführt. Dazu wurde infiziertes Gewebe drei Tage nach Infektion geerntet, fixiert und anschließend gefärbt. Für die Detektion von Stp1HA wurde ein monoklonaler Maus anti-HA Antikörper in einer Konzentration von 1:7500 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Maus-AF488 Konjugat (Molecular Probes, Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet. Für die Detektion von alpha-Tubulin wurde ein Maus anti-Tubulin Antikörper benutzt. Die gefärbten Pflanzenproben wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert.

#### 4.12 Färbungen, Mikroskopie und Bildverarbeitung

##### 4.12.1 Färbung mit Chlorazol Black E

Um *U. maydis* in infizierten Maisblättern sichtbar zu machen, wurden entsprechende Blattfragmente über Nacht in 100% Ethanol entfärbt. Am nächsten Tag wurde mit Wasser

gewaschen und anschließend für 3-4 h in 10% KOH bei 90°C permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurde das Blattfragment in Chlorazol Black E Färbelösung über Nacht bei 60°C inkubiert und anschließend für ca. 3 Tage in 50% Glycerin entfärbt. Die Proben wurden in Glycerin gelagert.

#### 4.12.2 Färbung mit Calcofluor White

Um *on planta* Hyphen und Appressorien von *U. maydis* sichtbar zu machen, wurden Blattproben zwischen 1 und 2 Tagen nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt entfernt und ein 2 cm langes Stück ca. 1 cm unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wird für ca. 30 s in Calcofluor (Fluorescent Brightener 28; 10 ng/ml) gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit Wasser wurde die Mittellamelle herausgetrennt und das Präparat mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt. Unter dem Mikroskop wurden die Proben mit Fluoreszenzlampe im DAPI-Filter betrachtet.

#### 4.12.3 Färbung mit WGA/Alexafluor-488 und Propidium-Iodid

Die Färbung diente der Visualisierung von Pilzhyphen (WGA/AF-488) in infizierten Pflanzen (1-8 dpi). Zusätzlich wurden Pflanzenzellwände mit Propidium-Iodid gegengefärbt. Außerdem können mit Propidium-Iodid tote Pflanzenzellen identifiziert werden, da sie eine verstärkte Färbung aufweisen. Die Blattproben wurden über Nacht (oder länger) 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 vakuuminfiltriert. Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie gelagert.

#### Stammlösungen:

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

#### 4.12.4 Färbung von Membranen mit FM4-64

Membranen von infiziertem Pflanzengewebe wurden modifiziert nach Kankanala *et al.* (2007) mit dem Farbstoff FM4-64 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt. Dazu wurde der Farbstoff in Wasser auf eine Konzentration von 8 µM (Stocklösung: 1 mg/ml in DMSO) verdünnt. Um Membranen in infizierten Pflanzenblättern zu visualisieren, wurden Blattproben zwischen 1 und 2 Tagen nach Infektion geerntet. Dazu wurde das 3. Blatt entfernt und ein 2 cm langes Stück ca. 1 cm unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wurde für 30 min – 1 h in der Farbstofflösung inkubiert, danach einmal mit Wasser gewaschen und anschließend mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Ggf. wurden *on planta* Pilzhyphen mit Calcofluor White gegengefärbt (s. 4.12.2).

#### 4.12.5 Diaminobenzidinfärbung

Für Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen wurden Blattspreiten infizierter Pflanzen (3. Blatt) in voller Länge geerntet und mit der Schnittfläche für 12 h in eine 1 mg/ml DAB Lösung inkubiert (RT/dunkel). Danach wurden die Blätter in einem Ethanol-Chloroform-Gemisch (4:1) bei 4°C entfärbt (1-2 Tage; dunkel) und mikroskopisch analysiert. Konserviert wurden die Präparate in 10% Glycerol bei dunkler Lagerung (RT).

#### 4.12.6 Plasmolyse von infiziertem Pflanzenmaterial

Für Plasmolyse-Experimente wurden infizierte Bereiche aus mit *U. maydis* infizierten Maispflanzen geerntet und für 5-30 min in 1 M NaCl inkubiert. Danach wurden die Proben mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht.

#### 4.12.7 Histochemischer Nachweis von GUS-Aktivität

Für die Visualisierung von GUS-Aktivität wurde Pflanzenmaterial mit GUS-Färbepuffer überschichtet und bei 100 mbar zweimal für fünf Minuten vakuumfiltriert (Vakuubrand CVC 2000, Wertheim; RT). Danach wurden die infiltrierten Blätter in Färbelösung bei 37°C für mindestens 12 h inkubiert. Zur Entfärbung wurde die Färbelösung durch 70% Ethanol ersetzt und für etwa zwei Stunden bei 60°C inkubiert. Bei Bedarf wurde das Ethanol mehrfach gewechselt.

GUS-Färbelösung	0,1 M NaPO <sub>4</sub> , pH 7,0 5% (v/v) Methanol 0,5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 0,5 mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]*3 H <sub>2</sub> O 10 mM EDTA (Na <sub>2</sub> ) 1mg/ml X-GlucA Cyclohexylammoniumsalz (Duchefa, Haarlem/Niederlande) 0,1% (v/v) Triton X-100
-----------------	--

#### 4.12.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologischen Betrachtungen von *U. maydis* erfolgten vorwiegend an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Aperatur verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgenden Anregungs- und Emissionsspektren eingesetzt: DAPI, 365 nm und >397 nm; GFP, 450-490 nm und 515-565 nm. Digitale Aufnahmen einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742, Hamamatsu) wurden mit den Programmen MetaMorph (Version 6.2r6) bearbeitet.

**Tabelle 15: Für die unterschiedlichen Anwendungen verwendete Laser und die detektierten Emissionswellenlängen.**

Laser	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
Argon Laser	488 nm	500-540 nm	WGA-AF488
Argon-Laser	488 nm	495-530 nm	GFP
Argon-Laser	488 nm	510-550 nm	YFP
Argon-Laser	458 nm	465-490 nm	CFP
405 Diode	405 nm	415-460 nm	Autofluoreszenz
561 nm DPSS Laser	561 nm	580-660 nm	RFP; FM4-64; PPI, mCherry



Für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs- sowie Emissionswellenlängen und der entsprechende dafür verwendete Laser sind für die verschiedenen Anwendungen in der Tabelle 15 dargestellt. Die Bildbearbeitung erfolgt vorwiegend mit zugehörigen LEICA Software (LAS AF; „Leica application suite“). DAB-Färbungen wurden zudem mit einer hochauflösenden Farbkamera visualisiert (DFC 500).

#### 4.13 Bioinformatische Analysen

Nukleotidsequenzen wurden der Datenbank GenBank, dem „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) entnommen. Unter <http://expasy.org>, dem „ExPASy Molecular Biology Server“, wurden Aminosäuresequenzen abgerufen. Außerdem stellt diese Seite viele weitere hilfreiche Programme zur Verfügung, mit denen beispielsweise die Molekulargewichte von Proteinen bestimmt wurden. Auch ein BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) Programm wird hier zur Verfügung gestellt. Multiple durch mit dem Blast-Programm erhaltene homologe Aminosäuresequenzen wurden mit dem ClustalW-Programm des „EMBL Outstation European Bioinformatics Institute“ auf der Seite <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> verglichen. Man erhält rechnerisch ermittelte Sequenzanalysen, bei denen homologe, ähnliche und konservierte Aminosäuren markiert und in Prozentwerten angegeben werden.

Domänenanalysen wurden mit dem Programm SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) durchgeführt (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Proteine wurden mittels der Programme SignalP ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)), ProtComp (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>) und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) auf eine N-terminale Signalsequenz bzw. anderweitige Lokalisierungssequenzen hin analysiert. So konnten auch putative Spaltstellen der Signalpeptidase in konventionell sekretierten Proteinen ermittelt werden.

In massenspektrometrischen Analysen erhaltenene Peptide wurden anhand des Programmes Mascot ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)) mit Datenbanken abgeglichen.

---

**5. LITERATURVERZEICHNIS**

- Abedon, B.G., Hatfield, R.D. und W.F. Tracy** (2006). Cell wall composition in juvenile and adult leaves of maize (*Z. mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 3896-3900.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. und G.B. Martin** (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO* 22: 60-69.
- Agrios, G.N.** (1988). Plant Pathology. *Academic Press, Inc.*, San Diego.
- Ainsworth, G.C.** (1965). *Ustilago maydis* (Descriptions of Fungi and Bacteria). *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria* 8: 79.
- Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Griggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E. und J.L. Beynon** (2004). Host-Parasite Coevolutionary Conflict Between *Arabidopsis* and Downy Mildew. *Science* 306(5703): 1957-1960.
- Angot, A., Vergunst, A., Genin, S. und N. Peeters** (2007). Exploitation of Eukaryotic Ubiquitin Signaling Pathways by Effectors Translocated by Bacterial Type III and Type IV Secretion Systems. *PLOS Pathogens* 3(1): e3 1-13.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. und F.M. Ausubel** (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kongston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. und K. Strukl** (1987). Current protocols in molecular microbiology. *John Wiley & Sons, Inc.*, USA.
- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D. und B.J. Staskawitz** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol. Microbiol.* 49: 1537-1546.
- Bader, O.** (2008). Zymogenaktivierung in humanpathogenen Pilzen. Charakterisierung des Substratspektrums regulatorischer Kex2-ähnlicher Proteasen. *Disseration*, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Backert, S. und T.F. Meyer** (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 207-217.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. und S.P. Dinesh-Kumar** (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet.* 8: 174-180.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genetics* 29: 179-208.
- Banuett, F. und I. Herskowitz** (1989). Different *a* alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *PNAS USA* 86: 5878-5882.
- Banuett, F. und I. Herskowitz** (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycol.* 18: 247-266.
- Banuett, F. und I. Herskowitz** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Dev.* 122: 2965-2976.
- Basse, C.W.** (2005). Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during *Ustilago maydis* infection and subsequent tumor formation. *Plant Physiol.* 138(3): 1774-1784.
- Basse, C.W., Kolb, S. und R. Kahmann** (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *U. maydis*. *Mol. Microbiol.* 43(1): 75-93.
- Bauer, R., Oberwinkler, F. und K. Vánky** (1997). Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can. J. Bot.* 75: 1273-1314.

- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A. und P. Schulze-Lefert** (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323(5910): 101-106.
- Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenzi, P. und M. Delledonne** (2003). AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur. J. Biochem.* 270: 2593-2604.
- Bevan, A.C., Brenner, C. und R.S. Fuller** (1998). Quantitative Assessment of enzyme specificity *in vivo*: P2 recognition by Kex2 protease defined in a genetic system. *PNAS USA* 95(18): 10384-10289.
- Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.D., Young, C., Kamoun, S. und K. Haldar** (2006). The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* 2(5): e50.
- Billet, E.E. und J.H. Burnett** (1978). The host-parasite physiology of the maize smut fungus *Ustilago maydis*. 11. Translocation of <sup>14</sup>C-labelled assimilates in smutted maize plants. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 102-112.
- Birch, P.R.J., Rehmany, A.P., Prichard, L., Kamoun, S. und J.L. Beynon** (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Tr. Microbiol.* 14: 8-11.
- Blum, E., Beier, H. und H.J. Gross** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bohlmann, R.** (1996). Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und R. Kahmann** (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* 73: 329-342.
- Bolton, M.D., van Esse, H.P., Vossen, J.H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J., van den Berg, G.C., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., de Koster, C.G., de Wit, P.J., Joosten, M.H. und B.P. Thomma** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol. Microbiol.* 69(1): 119-136.
- Bos, J.I., Kanneganti, T.D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R. und S. Kamoun** (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 48: 165-176.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.T., Sorieul, M., van den Dries, N. und C. Maurel** (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* 139(2): 790-805.
- Bowman, D.H.** (1946). Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. *J. Agric. Res.* 72: 233-243.
- Brachmann, A.** (1995). Suche nach frühen b-regulierten Genen in *Ustilago maydis* mit Hilfe der Methode des „Differential Display“. *Diplomarbeit*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer. *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P. und R. Kahmann** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 22(9): 2199-2210.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. und R. Kahmann** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 42(4): 1047-1063.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Brechler, V. Chu, W.N., Baxter, J.D., Thibault, G. und T.L. Reudelhuber** (1996). A Protease Processing Site Is Essential for Prorenin Sorting to the Regulated Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* 271(34): 20636-20640.
- Brefeld, O.** (1883). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 5: 67-75.
- Brefeld, O.** (1895). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie: Die Brandpilze II. 98.
- Brefort, T.; Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. und R. Kahmann** (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Ann. Rev. Phytopathol.* 47 (Eingereicht).
- Brefort, T., Molina, L., Doehlemann, G., Schipper, K., Mendoza-Mendoza, A., Mueller, O., Schirawski, J. und R. Kahmann** (2008a). The role of secreted proteins during the establishment of biotrophy in the *Ustilago maydis*/Maize pathosystem. In: *Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions* (Lorito, M., Woo, S., Scala, F. eds.) 6 (Im Druck).
- Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G. und R. Kahmann** (2008b). The biotrophic phase of *Ustilago maydis*: novel determinants for compatibility. In: *Genomics of Disease* (Gustafson, P. ed.), *Springer Verlag* (Im Druck).
- Brenner, C. und R.S. Fuller** (1992). Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *PNAS USA* 89(3): 922-926.
- Büttner, D. und U. Bonas** (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 193-200.
- Carpita, N.C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D.A., Catchpole, G., Wilson R.H. und M.C. McCann** (2001). Cell wall architecture of the elongating maize coleoptile. *Plant Physiol.* 127: 551-565.
- Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A. und J.G. Ellis** (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18: 243-256.
- Chen, S.X. und P. Schopfer** (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidases. *Eur. J. Biochem.* 260: 726-735.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. und B.J. Staskawicz** (2006). Host-microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer. Phytopathol. Soc. Monogr.* 2.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G. und F.M. Ausubel** (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323(5910): 95-101.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und L. Hsu** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *PNAS USA* 69: 2110-2114.
- Collins, N., Drake, J., Ayliffe, M., Sun, Q., Ellis, J., Hulbert, S. und T. Pryor** (1999). Molecular characterization of the maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell* 11: 1365-1376.
- Dangl, J.L.** (1995). Pièce de résistance: novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* 80: 363-366.
- Dangl, J.L. und J.D. Jones** (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411(6839): 826-833.
- Day, P.R. und S.L. Anagnostakis** (1971). Corn smut dikaryon in culture. *Nature New Biol.* 231: 19-20.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E.,**

- Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E. und B.W. Birren (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434(7036): 980-986.
- Desveaux, D., Singer, A.U. und J. Dangl (2006). Type III effector proteins: Doppelgängers of bacterial virulence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 376-382.
- Di Stasio, M., Brefort, T., Mendoza-Mendoza, A. und R. Kahmann (2009). The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* (Im Druck).
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Ayliffe, M.A. und J.G. Ellis (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16: 755-768.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., The, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B. und J. Ellis (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flux rust avirulence genes. *PNAS USA* 103: 8888-8893.
- Doebley, J. (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet.* 8(9): 302-307.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. und R. Kahmann (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis* is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.* (Im Druck).
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vraneš, M., De Vries, R.P., Kämper, J. und R. Kahmann (2008a). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J. Plant Physiol.* 165: 29-40.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. und J. Kämper (2008b). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J.* 56: 181-195.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X. und B.M. Tyler (2008). RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20(7): 1930-1947.
- Douglas, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34(3): 453-474.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K.H. und R. Hüchelhofen (2004). The barley apoptosis suppressor homologue BAX inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *MPMI* 17: 484-490.
- Eigenbrode, S.D. und K.E. Espelie (1995). Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 171-194.
- Ellis, J.G., Dodds, P.N. und G.J. Lawrence (2007). The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(4): 326-331.
- Farsing, J. (2004). Regulation des Mais-induzierten *mig2*-Genclustern in *U. maydis*. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Mullineaux, P.M. und N.R. Baker (2002). Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J. Exp. Bot.* 53: 1249-1254.
- Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I. und G. Steinberg (2006). Endocytosis Is Essential for Pathogenic Development in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 2066-2081.
- Garre, V., Tenberge, K.B. und R. Eising (1998). Secretion of a Fungal Extracellular Catalase by *Claviceps purpurea* During Infection of Rye: Putative Role in Pathogenicity and Suppression of Host Defense. *Phytopathol.* 88(8): 744-753.

- Gellissen, G. und C.P. Hollenberg** (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - a review. *Gene* 190(1): 87-97.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. und R. Kahmann** (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.
- Glombik, M.M. und H.H. Gerdes** (2000). Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: Secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie* 82: 315-326.
- Golic, K.G., und S. Lindquist** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* 59: 499-509.
- Gordon, C.L., Archer, D.B., Jeenes, D.J., Doonan, J.H., Wells, B., Trinci, A.P.J. und G.D. Robsona** (2000). A glucoamylase::GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. *J. Microbiol. Meth.* 42: 39-48.
- Gordon-Kamm, W.J., Spencer, T.M, Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brien, J.V., Chambers, S.A., Adams, W.R., Jr., Willetts, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P. und P.G. Lemaux** (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Gosh, P.** (2004). Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbio. Mol. Biol. Rev.* 68: 771-795.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und D. Hanahan** (1990). Differential Plasmid Rescue From Transgenic Mouse DNAs Into *Escherichia coli* Methylation-Restriction Mutants. *PNAS USA* 87(12): 4645-4549.
- Greenberg, J.T. und N. Yao** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6: 201-211.
- Hacker, J. und J.B. Kaper** (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
- Hahn, M. und K. Mendgen** (2001). Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 322-327.
- Haldar, K., Kamoun, S., Hiller, N.L., Bhattacharje, S. und C. van Ooij** (2006). Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(12): 922-931.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557-580.
- Hanna, W.F.** (1929). Studies on the physiology and cytology of *Ustilago zaeae* and *Sporisorium reilianum*. *Phytopathol.* 19: 415-442.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T. und J. Sheen** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125(3): 563-575.
- Health, M.** (2000). Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 321-334.
- Heese, A., Hann, R.D., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C. und J.P. Rathjen** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *PNAS USA* 104 (29): 12217-12222.
- Heidrich, K.** (2007). Identifizierung der die Virulenz negativ beeinflussenden Effektorgene im Cluster 2A von *Ustilago maydis*. *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Helenius, A., und M. Aebi** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291(5512): 2364-2369.

- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. und P.M. Mullineaux** (2000a). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Bio.* 42: 819-832.
- Hellens, R.P., Mullineaux, P. und H. Klee** (2000b). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5(10): 446-451.
- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C. und K. Haldar** (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306: 1934-1937.
- Hoffman, C.S. und F. Winston** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In King, R.C. (ed.) *Handbook of Genetics* 1, Plenum Press, New York/USA: 575-595.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C. und G.P. Pogue** (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J.* 30(3): 315-327.
- Horst, R.J., Engelsdorf, T., Sonnewald, U. und L.M. Voll** (2008). Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C<sub>4</sub> photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 165: 19-28.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. und N.P. Money** (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *PNAS USA* 88: 11281-11284.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., und T.K. Kerppola** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9: 789-798.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 101-127.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. und K.H. Kogel** (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119(4): 1251-1260.
- James, P., Halladay, J. und E.A. Craig** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4): 1425-1436.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A. und J.R. Alfano** (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* 37: 554-565.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B. und C.E. Stebbins** (2006). A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 311: 222-226.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. und B. Valent** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19: 4004-4014.
- Jones, J.D.G. und J.L. Dangl** (2006). The plant immune system. *Nat. Rev.* 444(16): 323-329.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M. und J. Kämper** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. Fungal Pathology. Kronstad, J.W. (ed.). *Kluwer academic publishers*. Dordrecht, The Netherlands: 347-371.
- Kamoun, S.** (2007). Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 358-365.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genomics* 271: 103-110.

- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, M., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A.B., deVries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., González-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C.H., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.-W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.D., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. und B. Birren (2006). Living in pretend harmony: insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97-101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und R. Kahmann (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* 81(1):73-83.
- Kankanala, P., Czymmek, K. und B. Valent (2007). Roles for the Rice Membrane Dynamics and Plasmodesmata during Biotrophic Invasion by the Blast Fungus. *Plant Cell* 19: 706-724.
- Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24: 447-463.
- Kemen, E., Kemen, A., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M. und R.T. Voegelé (2005). Identification of a Protein from Rust Transferred from Haustoria into Infected Plant Cells. *MPMI* 18(11): 1130-1139.
- Kim, C.Y., Koo, Y.D., Jin, J.B., Moon, B.C., Kang, C.H., Kim, S.T., Park, B.O., Lee, S.Y., Kim, M.L., Hwang, I., Kang, K.Y., Bahk, J.D., Lee, S.Y. und M.J. Cho (2003). Rice C2-domain proteins are induced and translocated to the plasma membrane in response to a fungal elicitor. *Biochem.* 42(40): 11625-11633.
- Koiwa, H., Bressan, R.A. und P.M. Hasegawa (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2: 379-384.
- Koncz, C. und J. Schell (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. *Mol. Gen. Gen.* 204: 383-396.
- Kuang, H., Wei, F., Marano, M.R., Wirtz, U., Wang, X., Liu, J., Shum, W.P., Zaborsky, J., Tallon, L.J., Rensink, W., Lobst, S., Zhang, P., Tornqvist, C.E., Tek, A., Bamberg, J., Helgeson, J., Fry, W., You, F., Luo, M.C., Jiang, J., Robin Buell, C. und B. Baker (2005). The R1 resistance gene cluster contains three groups of independently evolving, type I R1 homologues and shows substantial structural variation among haplotypes of *Solanum demissum*. *Plant J.* 44 (1): 37-51.
- Kudlicka, K. und R.M. Brown Jr. (1997). Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. I. Solubilization and separation of (1->3)- and (1->4)-[beta]-glucan synthase activities from mung bean. *Plant Physiol.* 115: 643-656.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. und G. Felix (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 3496-3507.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lahaye, T. und U. Bonas (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci.* 6: 479-485.



- LaVallie, E.R., DiBlasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., Lu, Z. und J.M. McCoy** (2003). Thioredoxin and Related Proteins as Multifunctional Fusion Tags for Soluble Expression in *E. coli*. *Methods In Molecular Biology: E. coli Gene Expression Protocols. Humana Press* 205: 119-140.
- Lee, J.C. und M.E. Peter** (2003). Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.* 193: 39-47.
- Leister, R.T. und F. Katagiri** (2000). A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *Plant J.* 22: 345-354.
- Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K.U. und D.H. Wolf** (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* 438: 61-65.
- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und R. Kahmann** (2001). A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 40(3): 719-730.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., und K.U. Fröhlich** (1999). Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *J. Cell Biol.* 145: 757-767.
- Maor, R. und K. Shirasu** (2005). The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(4): 399-404.
- Marti, M., Good, R.T., Fug, M., Knuepfer, E. und A.F. Cowman** (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306: 1930-1933.
- Martin, T.F.** (1997). Stages of regulated endocytosis. *Trends Cell Biol.* 7(7): 271-276.
- Martínez-Espinoza, A.D., García-Pedrajas, M.D. und S.E. Gold** (2002). The *Ustilaginales* as plant pests and model systems. *Fungal Genet. Biol.* 35(1): 1-20.
- Mendgen, K. und H. Deising** (1993). Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytol.* 124: 193-213.
- Mendgen, K. und M. Hahn** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7(8): 352-356.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vraneš, M., Kämper, J. und R. Kahmann** (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* (Im Druck).
- Molina, L. und R. Kahmann** (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19: 2293-2309.
- Molnar, G., Bancos, S., Nagy, F. und M. Szekeres** (2002). Characterisation of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 127-133.
- Money, N.P. und R.J. Howard** (1996). Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genet. Biol.* 20: 217-227.
- Morel, J.-B. und J.D. Dangl** (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4: 671-683.
- Morgan, W. und S. Kamoun** (2007). RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 332-338.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A. und R.P. de Vries** (2008): The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Gen. Biol.* 45: 63-70.
- Nickel, W.** (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* 270(10): 2109-2119.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F. und J.L. Dangl** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 37: 579-609.

- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumphin, N., Jones, J. und S.Y. He** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immune to cause plant disease. *Science* 313: 220-223.
- Nürnbergger, T. und F. Brunner** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 318-324.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und L. Piater** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249-266.
- O'Connell, R.J. und R. Panstruga** (2006). Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* 171(4): 699-718.
- Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L. und M.E. Alvarez** (2006). *Arabidopsis* displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *MPMI* 19(6): 577-587.
- Pennell, R.I. und C. Lamb** (1997). Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* 9(7): 1157-1168.
- Piepenbring, M., Stoll, M. und F. Oberwinkler** (2002). The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). *Mycol. Progress* 1: 71-80.
- Peri, P., Hukkanen, V., Nuutila, K., Saukko, P., Abrahamson, M. und T. Vuorinen** (2007). The cysteine protease inhibitors cystatins inhibit herpes simplex virus type 1-induced apoptosis and virus yield in Hep-2 cells. *J. Gen. Virol.* 88: 2101-2105.
- Prescianotto-Baschong, C. und H. Riezman** (2002) Ordering of compartments in the yeast endocytic pathway. *Traffic* 3: 37-49.
- Rakwal, R., Kumar Agrawal, G. und N.S., Jwa** (2001). Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene* 263: 189-198.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R. und C.W. Basse** (2008). Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol. Plant. Pathol.* 9(3): 339-355.
- Roberg, K.J., Rowley, N. und C.A. Kaiser** (1997). Physiological Regulation of Membrane Protein Sorting Late in the Secretory Pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 137(7): 1469-1482.
- Robinson, L.J. und T.F. Martin** (1998). Docking and fusion in neurosecretion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10(4): 483-492.
- Rockwell, N.C., Rockwell, D.J., Krysan, R. Tomoko, K. und R.S. Fuller** (2002). Precursor Processing by Kex2/Furin Proteases. *Chem. Rev.* 102 (12): 4525-4548.
- Rowell, J.B.** (1955). Functional role of compatibility factors and an *in vitro* test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. *Phytopathology* 45: 370-374.
- Salinas-Mondragon, R.E., Garciduenas-Pina, C. und P. Guzman** (1999). Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 40: 579-590.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und T. Maniatis** (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour*, New York.
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. und R.T. Fraley** (1987). Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res.* 15: 1543-1558.

- Sanger, F., Nicklen, S. und A.R. Coulson** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* 74: 5463-5467.
- Sauer, M., Paciorek, T., Benková, E. und J. Friml** (2006). Immunocytochemical techniques for whole-mount *in situ* protein localization in plants. *Nature Protocols* 1: 98-103.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. und J. Kämper** (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18(9): 2388-2401.
- Schöning, J.** (2006). Identifizierung von Clustern sekretierter Proteine und Analyse ihrer Funktion während der pathogenen Entwicklung von *Sporisorium reilianum*. *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Schreiner, R.P. und R.T. Koide** (1993). Mustards, Mustard Oils and Mycorrhizas. *New Phytologist* 123(1): 107-113.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und R. Kahmann** (1990). The *b* alleles of *Ustilago maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60: 295-306.
- Schulze-Lefert, P.** (2004). Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 377-383.
- Serrano, M. und P. Guzman** (2004). Isolation and gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants with constitutive expression of ATL2, an early elicitor-response RING-H2 zinc-finger gene. *Genetics* 167: 919-929.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S. und R.A. van der Hoorn** (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *Plant Cell* 20(4): 1169-1183.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E. und R.W. Innes** (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301: 1230-1233.
- Shen, Y.H., Saija, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I. und P. Schulze-Lefert** (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal resistance responses. *Science* 315: 1098-1103.
- Shoji, J., Arioka, M. und K. Kitamoto** (2008). Dissecting cellular components of the secretory pathway in filamentous fungi: insights into their application for protein production. *Biotechnol. Lett.* 30: 7-14.
- Sidrauski, C., Chapman, R. und P. Walter** (1998). The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* 8(6):245-249.
- Sleumer, H.O.** (1932). Über Sexualität und Zytologie von *Ustilago zaeae*. (Beckm.) *Unger. Z. Botan.* 25: 209-263.
- Snetselaar, K.M.** (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp. Mycol.* 17: 345-355.
- Snetselaar, K.M., Boelker, M. und R. Kahmann** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* 20: 299-312.
- Snetselaar, K.M. und C.W. Mims** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologica* 84: 193-203.
- Snetselaar, K.M. und C.W. Mims** (1993). Infection of maize by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* 83: 843-850.
- Snetselaar, K.M. und C.W. Mims** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* 98: 347-355.

- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menchem, E. und A. Levine** (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11: 431-444.
- Sorokin, A.V., Kim, E.R. und L.P. Ovchinnikov** (2007). Nucleocytoplasmic Transport of Proteins. *Biochemistry* (Moscow) 72(13): 1439-1457.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Southworth, M.W., Amaya, K., Evans, T.C., Xu, M.-Q. und F.B. Perler** (1999). Purification of Proteins Fused to Either the Amino or Carboxy Terminus of the *Mycobacterium xenopi* Gyrase A Intein. *Biotechniques* 27(1): 110-121.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. und R. Kahmann** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 13(7):1620-1627.
- Spellig, T., Bottin, A. und R. Kahmann** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital Marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 503-509.
- Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzoch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S. und R. Schekman** (2000). The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS USA* 97(8): 4034-4039.
- Stakman, E.C.** (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* 4: 193-299.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. und J.D.G. Jones** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.
- Stebbins, C.E. und J.E. Galan** (2001). Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412: 701-705.
- Steinberg, G. und J. Perez-Martin** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol.* 18(2): 61-67.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. und J.R. McIntosh** (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J. Cell Sci.* 111: 2235-2246.
- Straube, A.** (2003). Struktur und zelluläre Funktionen von cytoplasmatischem Dynein und Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts in *Ustilago maydis*. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. und G.B. Martin** (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 274: 2060-2063.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. und D.B. Collinge** (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11: 1187-1194.
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T. und S. Kamoun** (2004). A Kazal-like Extracellular Serine Protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* Targets the Tomato Pathogenesis-related Protease P69B. *J. Biol. Chem.* 279(25): 26370-26377.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und W.K. Holloman** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3703-3709.
- Van der Biezen, E.A. und J.D.G. Jones** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Plant Sci.* 23: 454-456.
- Van der Hoorn, R.A. und S. Kamoun** (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20(8): 2009-2017.

- Van Esse, H.P., Thomma, B.P., van 't Klooster, J.W. und P.J. de Wit** (2006). Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast. *J. Exp. Bot.* 57(3): 599-608.
- Venancio, E.J., Daher, B.S., Andrade, R.V., Soares, C.M.A., Pereira, I.S. und M.S.S. Felipe** (2002). The *kex2* gene from the dimorphic and human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* 19(14): 1221-1231.
- Von Röpenack, E., Parr, A. und P. Schulze-Lefert** (1998). Structural Analyses and Dynamics of Soluble and Cell Wall-bound Phenolics in a Broad Spectrum Resistance to the Powdery Mildew Fungus in Barley. *J. Biol. Chem.* 273(15): 9013-9022.
- Vraneš, M.** (2006). Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N. und A. Regev** (2007). Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* 449: 54-64.
- Weise, M.V.** (1987). Compendium of Wheat Diseases, 2nd ed. *APS Press*, St. Paul.
- Welply, J.K., Shenbagamurthi, P., Lennarz, W.J. und F. Naider** (1983). Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides. *J. Biol. Chem.* 258(19): 11856-11863.
- 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., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L. und P.R. Birch** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450: 115-118.
- Wild, K., Grafmueller, R., Wagner, E. und G.E. Schulz** (1997). Structure, catalysis and supramolecular assembly of adenylate kinase from maize. *Eur. J. Biochem.* 250: 326-331.
- Wösten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, M. und R. Kahmann** (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 15: 4274-4281.
- Yu, Q., Tang, C., Chen, Z. und J. Kuo** (1999). Extraction of apoplastic sap from plant roots by centrifugation. *New Phytol.* 143: 299-304.
- Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kämper, J. und M. Feldbrügge** (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 43(11): 727-738.
- Zeng, L.-R., Vega-Sánchez, M.E., Zhu, T. und G.-L. Wang** (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res.* 16: 413-426.
- Zipfel, C. und G. Felix** (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 353-360.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. und T. Boller** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana* through flagellin perception. *Nature* 428: 764-767.

# LEBENS LAUF

## Kerstin Schipper

Geboren am 29. September 1980 in Thuine

### SCHULAU SBILDUNG

1987-1991	Joseph-Tiesmeyer Grundschule, Emsbüren
1991-1993	Orientierungsstufe, Emsbüren
1993-2000	Gymnasium Georgianum, Lingen
2000	Allgemeine Hochschulreife

### STUDIUM

2000-2003	Bachelorstudium Biologie der Zellen, Universität Osnabrück
2003	Bachelorarbeit in der Abt. Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. R. Scheibe): „Isoformspezifische Regulation der Saccharose-Synthase-Isoform SUS3 in Mais“
2003-2005	Masterstudium Biologie der Zellen, Universität Osnabrück
2004/2005	Masterarbeit, durchgeführt an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abt. Mikrobiologie (PD Dr. H. Jung): „Heterologe Expression, Reinigung und initiale Charakterisierung des Zwei-Komponenten Systems PP4695/PP4696 in <i>Pseudomonas putida</i> “

### PROMOTION

2005-März 2009	Doktorarbeit an der Philipps-Universität Marburg, durchgeführt am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abt. Organismische Interaktionen, Marburg, unter der Betreuung von Prof. Dr. R. Kahmann
----------------	---

Mitglied der *International Max Planck Research School*  
des Max-Planck-Instituts, Marburg

Thema: „Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters, das für  
drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert“

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahmann für die Möglichkeit, an einem spannenden neuen *Ustilago*-Feld zu arbeiten, sowie für Ihre Betreuung und Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern meiner Promotionskommission Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Herrn Prof. Dr. Uwe Maier danken. Herrn Batschauer möchte ich außerdem für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ich danke den Mitgliedern meines IMPRS „Thesis Advisory Committee“, Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Herrn PD Dr. Rainer Hedderich. Ich habe in den Committee-Treffen einige hilfreiche Ideen und Anregungen erhalten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich über das rege Interesse und den Einsatz aller Mitglieder sehr gefreut!

Für die gute Kooperation danke ich Dr. Dirk Becker von der Universität Hamburg.

Ich danke vor allem den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe sowie allen Ehemaligen, aber auch den anderen Arbeitsgruppen in der Abteilung für Organismische Interaktionen für die Unterstützung und die Anregungen, die ich erhalten habe!

Ein Extra-Dankeschön geht an Gunther Döhlemann, der mir vor allem bei der konfokalen Mikroskopie und den Microarrays sehr geholfen hat, und an Armin Djamei für die vielen kleinen und größeren Gefälligkeiten und die tolle Zusammenarbeit. Thomas Brefort danke ich außerdem dafür, dass er mir zu Beginn meiner Arbeit *Usti* näher gebracht hat.

Für Ihre Unterstützung möchte ich mich vor allem bei Katharina Heidrich, Steffi Treitschke, Patrick Berndt, Karina van der Linde, Nadine Pawolleck, Gunther Döhlemann, Stefanie Reissmann, Armin Djamei, Alex Hof und Katja Zuther bedanken, die für mich nicht nur (Ex-)Arbeitskollegen, sondern auch Freunde geworden sind! Caro Weise möchte ich für die schöne Zeit und die Unternehmungen danken, die mir Ablenkung vom Doktorandenalltag verschafft haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an Stefanie Reissmann, Martin Thanbichler und Valentin! Bessere Nachbarn kann man nicht haben!

Bei all meinen Osnabrücker und Münchner Freunden, besonders bei Katrin B., Steffi K., Regina, Daniel H., Juliana und Steffi R. sowie bei Inga und den anderen Lohnern möchte ich mich dafür bedanken, dass sie trotz der räumlichen Entfernung einen super Kontakt aufrechterhalten haben! Ich habe mich darüber immer sehr gefreut! Danke vor allem an alle, die mich in Marburg besucht haben. Ein ganz besonderer Dank geht auch an Wiebke, für alle Emails und Telefonate, für die erholsamen Zeiten in Cornwall und den ständigen Austausch über Doktorandenprobleme! Daniela Holtgräwe möchte ich danken, weil sie mir während der Bachelorarbeit alle wichtigen „Labor-Essentials“ beigebracht hat!

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern und Dorothee, für Ihre ständige Unterstützung und Ihre Besuche bedanken!

