

Die Rolle von programmiertem Zelltod in der epidermalen Resistenz von Gerste



Dissertation

zur

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

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Alexander Hof

aus Gladenbach-Rüchenbach

Marburg/Lahn, 2013

Die Rolle von programmiertem Zelltod in der epidermalen Resistenz von Gerste

Dissertation

zur

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

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Alexander Hof

aus Gladenbach-Rüchenbach

Marburg/Lahn, 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2009 bis Juni 2013 unter der Betreuung von PD Dr. Gunther Döhlemann am Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen in Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 13.06.2013

Erstgutachter: PD Dr. Gunther Döhlemann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2013

Teile dieser Arbeit werden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Hof, A., Zechmann, B., Schwammbach, D., Hückelhoven, R., und Doehlemann G. (2013). Alternative cell death mechanisms determine epidermal resistance in incompatible barley-*Ustilago* interactions. (in Arbeit)

Bisherige Veröffentlichung:

Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. und Kahmann, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis* is required for successful invasion of plant cells. *Plos Pathog.* **5**, e1000290.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von programmiertem Zelltod in der epidermalen Resistenz von Gerste“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

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

(Ort / Datum)

(Alexander Hof)

„What we know is a drop, what we don't know is an ocean“

Sir Isaac Newton

(1643-1727)

„Nur wer seinen eigenen Weg geht, kann von niemandem überholt werden“

Marlon Brando

(1924-2004)

Für Elise

Zusammenfassung

Ustilago hordei ist der Erreger von Hartbrand bei Gerste und Hafer. Um pflanzlichen Abwehrreaktionen entgegenzuwirken ist dieser basidiomycete Brandpilz zur Etablierung einer biotrophen Interaktion mit seiner Wirtspflanze auf eine Vielzahl sekretierter Effektorproteine angewiesen, wobei der Unterdrückung von programmiertem Zelltod eine besondere Rolle zukommt.

Deletionsmutanten für den sekretierten Effektor Pep1 sind hingegen nicht in der Lage die Epidermis zu penetrieren und verursachen zahlreiche Abwehrreaktionen, welche im programmierten Zelltod der attackierten Pflanzenzelle resultieren. Im Maispathogen *Ustilago maydis* ist der Virulenzfaktor Pep1 funktionell konserviert und inhibiert den PAMP-vermittelten ‚oxidative burst‘ durch direkte Interaktion mit apoplastischen Peroxidasen. Infektionen von Gerste mit dem inkompatiblen Nicht-Wirt-Pathogen *U. maydis* führen ebenfalls zu epidermalem Zelltod, ähnlich einer hypersensitiven Antwort (HR; *hypersensitive response*).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen und zellulären Prozessen in kompatiblen und inkompatiblen *Ustilago*/Gerste-Interaktionen.

Anhand einer *U. hordei* Transkriptomanalyse während kompatiblen sowie inkompatiblen Interaktionen wurden 18 Kandidatengene ausgewählt, die auf eine Rolle während der Wirtsbesiedelung untersucht werden sollten. Vorläufige Ergebnisse zeigen bislang fünf Kandidaten mit einer möglichen Virulenzfunktion.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die zellulären Reaktionen bei Gerste während *Ustilago*-Interaktionen untersucht. Hier wurde zwischen der kompatiblen Interaktion mit *U. hordei* und den inkompatiblen Interaktionen mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *U. maydis*, sowie der *U. hordei* und *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante verglichen. Zwar resultiert Inkompatibilität jeweils in programmiertem Zelltod, mittels verschiedener Lebendzellfärbungen, einem enzymatischen Aktivitätstest und Infektionen *Bax Inhibitor-1* (BI-1)-überexprimierender Pflanzen konnte jedoch zwischen zwei verschiedenen Zelltodarten unterschieden werden. Während Autophagie an Zelltod bei $\Delta pep1$ -Infektionen beteiligt ist, kommt es in Abhängigkeit von BI-1 zu Apoptose-ähnlichem Zelltod nach *U. maydis*-Infektion. Dies konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden. Zusätzlich haben die Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Apoplastenflüssigkeit und die Genregulation typischer HR-assoziiierter Marker gezeigt, dass eine HR nur durch *U. maydis* ausgelöst wird, während $\Delta pep1$ -Infektionen in einer basalen, PAMP-vermittelten Immunität resultieren.

Demnach konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zelltodmechanismen die Resistenz von Gerste in Abhängigkeit des infizierenden Pathogens determinieren.

Summary

Ustilago hordei is the causative agent of covered smut on barley and oat. This basidiomycetous fungus establishes a biotrophic interaction with its host plant and therefore relies on a great variety of secreted effector proteins in order to cope with plant defense responses. This particularly implies the avoidance of host cell death reactions.

Deletion mutants of the secreted effector Pep1 are blocked in epidermal penetration and elicit various plant defense responses, eventually leading to death of the invaded cell. The virulence factor Pep1 is functionally conserved in the corn smut pathogen *Ustilago maydis* and was recently shown to directly interact with apoplastic peroxidases, thus inhibiting the PAMP-triggered oxidative burst. Barley infections with the incompatible non-host pathogen *U. maydis* also result in epidermal cell death, which is similar to the hypersensitive response (HR).

This study concentrates on molecular and cellular processes determining compatibility and incompatibility in different *Ustilago*/barley-interactions.

Based on transcriptional analyses of *U. hordei* genes involved in compatible and incompatible plant interactions, 18 candidate genes were selected and further analyzed for a potential role during host colonization. So far, preliminary results point towards a virulence function of five candidates.

In the second part of this study cellular responses of barley were investigated, comparing the compatible *U. hordei*-interaction with responses during incompatibility caused by the non-host pathogen *U. maydis* as well as *U. hordei* and *U. maydis* $\Delta pep1$ mutants. Although incompatibility leads to programmed cell death respectively, a combination of live cell imaging techniques, an enzymatic activity assay and infections of transgenic plants overexpressing *Bax Inhibitor-1* (BI-1) enabled the differentiation of two distinct pathways. While cell death responses towards $\Delta pep1$ mutants involve autophagy, non-host reactions after *U. maydis* infection trigger BI-1-dependent apoptosis-like cell death. These data sets were supported by transmission electron microscopy. Additionally, by evaluating H₂O₂ contents in apoplastic fluid and the transcriptional regulation of typical HR-associated marker genes, it became apparent that a HR is only caused by *U. maydis* infections, whereas infections by $\Delta pep1$ mutants result in basal defense and PAMP-triggered immunity.

Therefore it was shown, that different cell death mechanisms determine resistance of barley in host and non-host interactions.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	zum Endvolumen auffüllen
AIF	(<i>apoptosis-inducing factor</i>)
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
ATG	<i>„AuTophGy“</i>
Avr-(Protein)	Avirulenzprotein
BI-1	Bax Inhibitor-1
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-terminal	carboxyterminal
cDNA	<i>„complementary DNA“</i>
CLPs	Caspase-ähnliche Proteasen (<i>„caspase-like proteases“</i>)
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	<i>„damage-associated molecular pattern“</i>
DAPI	4', 6'-Diamino-2-Phenylindol
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DIC	<i>„differential interference contrast“</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion (<i>„days post infection“</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETI	Effektor-vermittelte Immunität (<i>„effector-triggered immunity“</i>)
ETS	Effektor-vermittelte Suszeptibilität (<i>„effector-triggered susceptibility“</i>)
FDA	Fluorescein-Diacetat
fw	<i>„forward“</i>
ggf.	gegebenenfalls
h / hrs	Stunde/Stunden
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser
hpi	Stunden nach Infektion (<i>„hours post infection“</i>)
HR	hypersensitive Reaktion (<i>„hypersensitivity response“</i>)
HSTs	Wirts-spezifische Toxine (<i>„host-specific toxins“</i>)
<i>in planta</i>	innerhalb des Pflanzengewebes
JA	Jasmonsäure (<i>„jasmonic acid“</i>)
kb	Kilobasen(paare)
LRR	<i>„leucin rich repeat“</i>

M	Molar (g/L)
MAP	<i>„mitogen-activated“</i>
MDC	Monodansylcadaverin
min	Minute(n)
mM	Millimolar (mg/L)
mRNA	<i>„messenger“</i> RNA
N-terminal	aminoterminal
NB	<i>„nucleotide-binding“</i>
NCD	nekrotischer Zelltod (<i>„necrotic cell death“</i>)
ng	Nanogramm
NHI	Nicht-Wirt-Interaktion (<i>„non-host interaction“</i>)
NHR	Nicht-Wirt-Resistenz (<i>„non-host resistance“</i>)
nt	Nukleotid(e)
OA	Oxalsäure (<i>„oxalic acid“</i>)
ODx nm	optische Dichte gemessen bei x nm
<i>on planta</i>	auf der Pflanzenoberfläche
PAMP/MAMP	<i>„pathogen-/microbe-associated molecular pattern“</i>
PCD	programmierter Zelltod (<i>„programmed cell death“</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>„polymerase chain reaction“</i>)
PD	<i>„potato dextrose“</i>
PR	<i>„pathogenesis-related“</i>
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PRR	<i>„pattern recognition receptor“</i>
PTI	PAMP-vermittelte Immunität (<i>„PAMP-triggered immunity“</i>)
qRT-PCR	quantitative <i>„real-time“</i> Polymerasekettenreaktion
R-(Protein)	Resistenzprotein
rev / rv	<i>„reverse“</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>„reactive oxygen species“</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>„reverse transcripton“</i> Polymerasekettenreaktion
s / sec	Sekunde(n)
SA	Salizylsäure (<i>„salicylic acid“</i>)
SAR	<i>„systemic aquired resistance“</i>
TAE	Tris-Acetat + Na ₂ -EDTA
TBE	Tris-Borat + Na ₂ -EDTA
TE	Tris-Cl + Na ₂ -EDTA

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TLRs	Toll-ähnliche Rezeptoren (<i>,toll-like receptors'</i>)
U	Unit (Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
VCD	vakuolärer Zelltod (<i>,vacuolar cell death'</i>)
vgl.	vergleiche
VPE	<i>,vacuolar processing enzyme'</i>
WGA	<i>,wheat germ agglutinin'</i>
wzB.	wie zum Beispiel
XO	Xylenolorange
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Uh WT	<i>Ustilago hordei</i>
Uh Δpep1	<i>Ustilago hordei pep1</i> -Deletionsmutante
Um WT	<i>Ustilago maydis</i>
Um Δpep1	<i>Ustilago maydis pep1</i> -Deletionsmutante

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Infektions- und Entwicklungsstrategien phytopathogener Mikroorganismen.....	1
1.2 Grundlegende Mechanismen der pflanzlichen Immunabwehr	3
1.2.1 Die Rolle des ‚oxidative burst‘ während der Pflanzenabwehr	6
1.3 Programmierter Zelltod als Überlebensstrategie für Tiere und Pflanzen.....	7
1.3.1 Mechanismen der Zelltod-Induktion in tierischen Systemen.....	7
1.3.2 Programmierter Zelltod in Pflanzen	10
1.3.3 BI-1, ein konservierter Zelltod-Suppressor	12
1.4 Phytopathogene Brandpilze	13
1.4.1 Die Modellsysteme <i>Ustilago maydis</i> und <i>Ustilago hordei</i>	14
1.4.2 Die Lebenszyklen von <i>U. maydis</i> und <i>U. hordei</i>	16
1.5 Sekretierte Effektoren und deren Rolle für Biotrophie und Pathogenität.....	19
1.5.1 Pep1, ein konservierter Virulenzfaktor	23
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	23
2 Ergebnisse	25
2.1 Charakterisierung der frühen Infektionsphase von <i>U. hordei</i>	25
2.1.1 <i>U. hordei</i> unterdrückt aktiv PAMP-induzierten Zelltod	28
2.2 Identifizierung von <i>U. hordei</i> -Effektoren mit Virulenz-relevanter Funktion	30
2.2.1 Transkriptomdaten als Basis für die Auswahl von Kandidatengenen	30
2.2.2 Deletion, Verifizierung und Untersuchung der Kandidatengene	32
2.3 Zelltod in inkompatiblen <i>Ustilago</i> /Gerste-Interaktionen	35
2.3.1 Inkompatible Interaktionen führen zu programmiertem Zelltod.....	35
2.3.2 Einfluß von Bax Inhibitor-1 auf die epidermale Resistenz von Gerste	38
2.4 Determination der beteiligten Zelltod-Mechanismen	42
2.4.1 Infektionen mit <i>U. maydis</i> induzieren Apoptose-ähnlichen Zelltod	42
2.4.2 Abwehrreaktionen gegenüber $\Delta pep1$ -Mutanten führen zu Autophagie	44

2.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie zeigt charakteristische Zelltodmerkmale	46
2.4.4 Die induzierten Abwehrreaktionen variieren in Zeitpunkt und Intensität	48
3 Diskussion	52
3.1 <i>U. hordei</i> etabliert eine biotrophe Interaktion mit Gerste	52
3.2 <i>U. hordei</i> unterdrückt aktiv pflanzliche Abwehrreaktionen.....	53
3.3 <i>U. maydis</i> und <i>pep1</i> -Deletionsmutanten sind inkompatible Gersten-Pathogene ...	57
3.4 Nicht-Wirt-Resistenz resultiert aus Apoptose-ähnlichem Zelltod.....	59
3.5 Autophagie geht einher mit $\Delta pep1$ -Infektionen.....	61
3.6 Inkompatibilität gegenüber $\Delta pep1$ -Mutanten bzw. <i>U. maydis</i> beruht auf PAMP- bzw. Effektor-vermittelter Immunität	65
3.7 Model zur Zelltod-Induktion im <i>Ustilago</i> /Gerste-Pathosystem.....	67
3.8 Perspektiven	70
4 Material und Methoden	72
4.1 Material und Bezugsquellen	72
4.1.1 Chemikalien	72
4.1.2 Puffer und Lösungen.....	72
4.1.3 Enzyme	72
4.1.4 Verwendete Kits und sonstige Materialien	72
4.2 Zellkultivierung.....	73
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	73
4.2.2 <i>Ustilago hordei</i> und <i>Ustilago maydis</i>	74
4.2.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen.....	74
4.3 Stämme, Oligonukleotide und Vektoren	75
4.3.1 <i>E. coli</i> -Stämme.....	75
4.3.2 <i>U. maydis</i> -Stämme	75
4.3.3 <i>U. hordei</i> -Stämme.....	75
4.3.5 Oligonukleotide	77
4.3.6 Vektoren.....	86

4.4 Mikrobiologische Standardmethoden	89
4.4.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von <i>E. coli</i>	89
4.4.2 Blau-Weiß-Selektion von <i>E. coli</i> -Transformanden	89
4.4.3 Transformation von <i>U. hordei</i>	90
4.4.4 Test auf filamentöses Wachstum von <i>U. hordei</i> und <i>U. maydis</i>	91
4.5 Molekularbiologische Methoden	91
4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	91
4.5.2 Isolierung genomischer DNA aus <i>U. hordei</i>	92
4.5.3 Isolierung genomischer DNA aus Gerste.....	92
4.5.4 Isolierung von RNA aus infiziertem Gerstengewebe	92
4.5.5 Aufreinigung von RNA	92
4.5.6 Gleichzeitige Isolierung von DNA und RNA aus infiziertem Gerstengewebe ..	93
4.5.7 <i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	93
4.5.7.1 Restriktion	93
4.5.7.2 Dephosphorylierung linearer DNA.....	93
4.5.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	93
4.5.8 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	94
4.5.9 Aufreinigung von Nukleinsäuren	95
4.5.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	95
4.5.11 Sequenzierung von Nukleinsäuren	96
4.5.12 Quantitative <i>real-time</i> PCR	96
4.6 Proteinbiochemische Methoden	97
4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford	97
4.6.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus Gerste	97
4.6.3 Caspase-Aktivitätstest	97
4.6.4 Gewinnung von Apoplastenflüssigkeit	98
4.6.5 Nachweis von Wasserstoffperoxid durch Xylenolorange-Färbung	98
4.7 Pflanzenmethoden.....	99
4.7.1 Verwendete Gerstenkultivare (<i>Hordeum vulgare</i> sp.).....	99

4.7.2 Kultivierung von <i>H. vulgare</i>	99
4.7.3 Infektion von <i>H. vulgare</i> mit <i>U. hordei</i> und <i>U. maydis</i>	99
4.7.4 Infiltration von <i>H. vulgare</i> mit Chitosan	99
4.8 Färbungen, Mikroskopie und Bildverarbeitung	100
4.8.1 Konfokale Mikroskopie	100
4.8.2 Färbung mit Calcofluor White	100
4.8.3 Färbung mit WGA-AF488 und Propidiumiodid.....	100
4.8.4 Färbung mit FDA/FM4-64 und Calcofluor White	101
4.8.5 Färbung mit Diaminobenzidin	102
4.8.6 Färbung mit Trypanblau	102
4.8.7 Färbung mit Monodansylcadaverin	102
4.8.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung	103
4.8.9 Transmissionselektronenmikroskopie	103
5 Literaturverzeichnis	104

1 Einleitung

Interaktionen zwischen Pilzen und Pflanzen reichen von mutualistischen Symbiosen bis hin zu Parasitismus. Während jedoch auf der einen Seite beide Symbiose-Partner einen Nutzen aus der Interaktion ziehen, bleibt auf der anderen Seite beim Parasitismus das Vorteilsverhältnis im Ungleichgewicht. Begünstigt ist hierbei jeweils der Pilz, der den parasitären bzw. pathogenen Teil der Interaktion bildet und die Pflanze als Wirt nutzt, welche dadurch meist in Wachstum oder Reproduktionsfähigkeit eingeschränkt ist oder gar aufgrund des starken Pathogenbefalls komplett abstirbt.

Pflanzen werden allerdings nicht nur mit einer sehr großen Varietät an phytopathogenen Pilzen konfrontiert, sondern auch phytopathogene Bakterien, Viren und Oomyceten, sowie Nematoden und Insekten stellen potenzielle Gefahren dar. Ein hocheffizientes Immunsystem sorgt jedoch dafür, dass Pflanzen ihren Gegnern nicht schutzlos ausgeliefert sind. Schafft es ein Pathogen dennoch sich erfolgreich zu etablieren, kann dies gravierende Folgen haben. Im Bereich der Nutzpflanzen wird beispielsweise angenommen, dass weltweit ein jährlicher Ernteverlust von 16-18% dem Befall von Pflanzenpathogenen zuzuschreiben ist (Oerke und Dehne, 1997; Oerke, 2006). Hierbei spielen auch Brandpilze der Gruppe *Ustilaginales* eine Rolle, da sie bedeutende Gras- und Getreidearten befallen (Martínez-Espinoza et al., 2002).

Das Verständnis der Infektionsstrategien phytopathogener Pilze, der detaillierten pflanzlichen Abwehrreaktionen, sowie des Zusammenspiels beider um eine Interaktion zu etablieren bzw. zu verhindern ist somit von großer Relevanz für wirtschaftliche und biologische Fragestellungen.

1.1 Infektions- und Entwicklungsstrategien phytopathogener Mikroorganismen

Um sich im jeweiligen Wirt erfolgreich etablieren zu können nutzen Pflanzenpathogene unterschiedliche Infektions- und Entwicklungsstrategien. Diese kann man primär anhand der Ernährungsform in drei Gruppen unterteilen: Nekrotrophie, Biotrophie und Hemibiotrophie.

Bei der nekrotrophen Ernährungsform tötet das Pathogen die attackierte Pflanzenzelle ab, um sich saprophytisch von dem abgestorbenen Material ernähren zu können. Nekrotrophe Pilze wie beispielsweise *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. oder *Verticillium* spp. sekretieren hierfür entweder Wirts-spezifische Toxine (HSTs; *host-specific toxins*) oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS; *reactive oxygen species*) wodurch Zelltod ausgelöst wird (Friesen et al., 2008; Horbach et al., 2011). Biotrophie definiert sich hingegen als Ernährungsform, bei der ein Organismus auf das Vorhandensein lebender

Wirtszellen angewiesen ist. Dadurch gestalten sich biotrophe Interaktionen sehr unterschiedlich und reichen von mutualistisch bis parasitisch. Die meisten mutualistischen Organismen, wie zum Beispiel Mykorrhiza-Pilze, besiedeln pflanzliches Wurzelgewebe, sind aber in der Lage Nährstoffe auch von außerhalb der Symbiose aufzunehmen. Im Gegensatz dazu beziehen die meisten parasitisch-biotrophen Pathogene, wie Brand- und Rostpilze, ihre Nährstoffe ausschließlich aus wachsendem Gewebe, da sie keinen Zugang zu alternativen Energiequellen haben (Schulze-Lefert und Panstruga, 2003; Horbach et al., 2011). Biotrophe Pilze wie beispielsweise *Ustilago* spp., *Puccinia* spp. oder *Uromyces* spp. müssen daher die etablierte biotrophe Interaktion mit ihrem Wirt über die gesamte Generationszeit bis hin zur Sporulation aufrechterhalten (Mendgen und Hahn, 2002; Horbach et al., 2011). Ist die biotrophe Phase hingegen nur vorübergehend und das Pathogen schaltet nach anfänglicher Biotrophie auf ein nekrotrophes Wachstumsprogramm um, handelt es sich um die hemibiotrophe Ernährungsform, wie es zum Beispiel bei *Phytophthora* spp. oder *Colletotrichum* spp. der Fall ist (Hahn und Mendgen, 2001; Horbach et al., 2011).

Zusätzlich kann man Pathogene dahingehend kategorisieren, ob sie über Stomata, oder durch Verletzungen in das Wirtsgewebe eindringen, wie beispielsweise *Pseudomonas syringae* bzw. *Agrobacterium tumefaciens*, oder ob sie dieses direkt penetrieren können, wie zum Beispiel *Blumeria graminis* (Hawes und Smith 1989; Melotto et al., 2006; Hückelhoven und Panstruga, 2011; Faulkner und Robatzek, 2012).

Filamentöse Pathogene können zudem anhand ihrer Wachstumsform innerhalb der Wirtspflanze differenziert werden. So unterscheidet man zum Beispiel interzellulär, wie bei *Cladosporium fulvum*, intrazellulär, wie bei *Magnaporthe oryzae*, oder gar inter- und intrazellulär, wie bei monokaryotischen Rostpilzen und diversen Brandpilzen. Zudem unterscheidet man zwischen extrazellulärem Wachstum mit Haustorien innerhalb der Epidermiszellen, wie bei der Ordnung der *Erysiphales* und interzellulärem Wachstum mit Haustorien in Zellen des Parenchymgewebes, wie bei dikaryotischen Rostpilzen (Hahn und Mendgen, 2001; Mendgen und Hahn, 2002; Faulkner und Robatzek, 2012).

Gemeinsam haben jedoch alle Pflanzenpathogene, dass sie zur erfolgreichen Etablierung und zum Durchlaufen ihres Lebenszyklus das pflanzliche Immunsystem umgehen müssen. Insbesondere für biotrophe Pathogene ist es essentiell die Pflanzenabwehr zu unterdrücken und speziell programmierten Zelltod (PCD; *programmed cell death*) zu verhindern. Hierfür muss das Pathogen auf spezifischem Weg mit der Wirtspflanze interagieren, was durch kleine sekretierte Proteine, sogenannte Effektoren bewerkstelligt wird. Dies sind Moleküle, welche die Struktur und Funktion der Pflanzenzelle manipulieren und hierüber eine erfolgreiche Etablierung des Pathogens ermöglichen (Kamoun 2006; Hogenhout et al., 2009; De Wit et al., 2009; Stergiopoulos und De Wit, 2009).

1.2 Grundlegende Mechanismen der pflanzlichen Immunabwehr

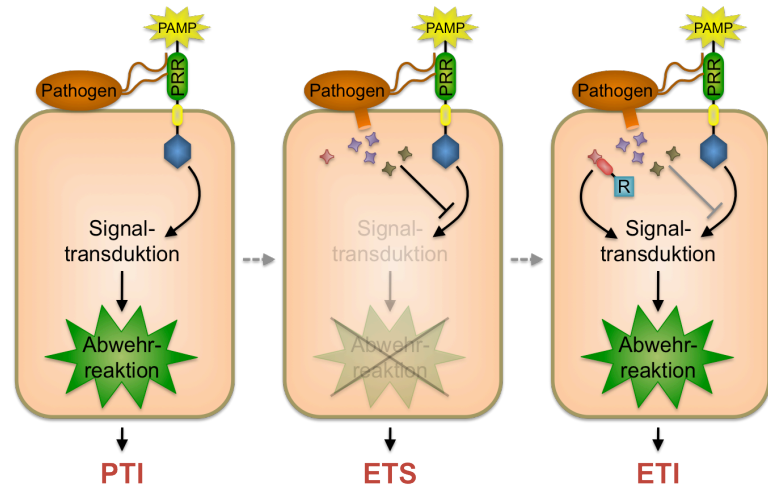
Pflanzen begegnen dem kontinuierlichen Einfluss von potenziellen Pathogenen mit einem vielschichtig aufgebautem Verteidigungssystem (Dangl und Jones, 2001; Nimchuk et al., 2003; Chrischold et al., 2006; De Wit, 2007). Hierbei wird zwischen präformierter Abwehr und induzierter Abwehr unterschieden.

Präformierte Abwehrmechanismen sind zum einen physische Barrieren, wie zum Beispiel die Pflanzenzellwand und die wachsartige Cuticula, die sowohl Pathogenen das Eindringen ins Pflanzengewebe erschweren, als auch vor Wasserverlust und anderen abiotischen Umwelteinflüssen schützen (Dangl und Jones, 2001; Hückelhoven, 2007; Koeck et al., 2011). Zum anderen bieten von der Pflanze produzierte antimikrobielle Stoffe und Sekundärmetabolite wie Defensine, Phytoalexine und phenolische Substanzen einen biochemischen Schutz (Zaslhoff, 2002; Baidez et al., 2007).

Die induzierbare Abwehr reagiert spezifisch auf verschiedene Arten von Pathogenbefall (Dangl und Jones, 2001; Chrischold et al., 2006; Da Cunha et al., 2006; Jones und Dangl, 2006). Die primäre Stufe dient hierbei der Erkennung von konservierten Strukturen, die für viele Klassen von Mikroben und Pathogenen charakteristisch sind. Zu den sogenannten MAMPs oder PAMPs (*microbe- / pathogen-associated molecular patterns*) zählen zum Beispiel das bakterielle Geißelprotein Flagellin oder das in Pilzzellwänden vorkommende Chitin. Die Erkennung basiert auf PRR-Membranrezeptoren (*pattern recognition receptors*), deren extrazelluläre LRR-Domäne (*leucine rich repeat*) für die Perzeption verantwortlich ist, während die cytoplasmatische Kinase-Domäne abwehrspezifische MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*) Signalkaskaden aktiviert (Nürnberg und Brunner, 2002; Nürnberg et al., 2004; Zipfel und Felix, 2005; Zipfel et al., 2006; Boller und He, 2009; Iriti und Faoro, 2009; Zhang und Zhou, 2010). Das hat zur Folge, dass Salizylsäure (SA, *salicylic acid*)-abhängige Abwehrreaktionen wie zum Beispiel Lignifizierung der pflanzlichen Zellwand, Papillenbildung durch Deposition von Callose, sowie die Akkumulation von PR-Proteinen (*pathogenesis-related proteins*), wie Chitinasen, Glucanasen und Proteasen, induziert werden. Gleichzeitig kommt es zur Bildung und Anreicherung von ROS (Brown et al., 1998; Gomez-Gomez et al., 1999; van Loon et al., 2006; Bhuiyan et al., 2009; Luna et al., 2011). Diese Abwehrmechanismen üben einen negativen Effekt auf die Kolonisierung des Pathogens aus und können zum programmierten Zelltod der attackierten Zelle führen (Naito et al., 2008; Zipfel, 2009; Thomma et al., 2011). Somit kommt es zur PAMP-vermittelten Immunität (PTI; *PAMP-triggered immunity*) (Abb. 1) (Jones und Dangl, 2006). Solche Abwehrprozesse können aber nicht nur durch exogene Elizitoren, sondern auch durch pflanzeneigene, endogene Elizitoren ausgelöst werden. Bei DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) handelt es sich um Moleküle die von Pflanzenzellen freigesetzt werden, wenn es beispielsweise

durch Fressfeinde oder Pathogenbefall zu Verletzungen des Gewebes kommt. Deren Erkennung durch PRRs basiert auf dem gleichen Mechanismus wie die PAMP/MAMP-Erkennung und resultiert ebenfalls in PTI (Lotze et al., 2007; Rubartelli und Lotze, 2007; Boller und Felix, 2009). Durch die Sekretion spezifischer Effektormoleküle sind adaptierte Pflanzenpathogene jedoch in der Lage mit der primären Immunantwort zu interferieren

Abb. 1: Die Grundlagen der pflanzlichen Immunabwehr. Schematische Darstellung der molekularen und zellulären Abläufe während der basalen und der induzierbaren Pflanzenabwehr. Abhängig von Pathogen und Wirtspflanze führen sie zur PAMP-vermittelten Immunität (PTI), zur Effektor-vermittelten Suszeptibilität (ETS) oder zur Effektor-vermittelten Immunität (ETI). Details, siehe Text. Modifiziert nach Pieterse et al., 2009.



und so die PTI zu unterdrücken, wodurch sich das Pathogen erfolgreich im Gewebe des Wirts etablieren kann. Somit kommt es zur Effektor-vermittelten Suszeptibilität (ETS; *effector-triggered susceptibility*) (Abb. 1) (Jones und Dangl, 2006; Stergiopoulos und de Wit, 2009; de Wit et al., 2009). Die zweite, spezifischere Stufe der pflanzlichen Immunabwehr wird als Effektor-vermittelte Immunität (ETI; *effector-triggered immunity*) bezeichnet, da Effektoren nicht nur für die Pathogenität von Bedeutung sind, sondern gleichzeitig auch die häufigsten Avirulenz-Faktoren (Avr-Proteine) repräsentieren, Faktoren die vom Immunsystem der Pflanze erkannt werden und dadurch zur Resistenz führen (Abb.1) (Dangl und Jones, 2001; Rep, 2005; Chrisohm et al., 2006; Jones und Dangl, 2006). Die Erkennung der Effektoren erfolgt durch eine Klasse von Rezeptoren, die aus einer konservierten NB- (*nucleotide binding*) und einer Spezifität-vermittelnden LRR-Domäne bestehen, den sogenannten NB-LRR-Proteinen, und zu der fast alle pflanzlichen Resistenzproteine (R-Proteine) gehören. Die Erkennung kann hierbei direkt oder indirekt stattfinden. Eine direkte, physische Interaktion eines Avr-Proteins mit dem korrespondierenden R-Protein wird durch die Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1971) beschrieben und konnte beispielsweise für den *Magnaporthe oryzae* Effektor Avr-Pita gezeigt werden, der spezifisch mit dem cytoplasmatischen R-Protein Pi-ta aus Reis (*Oryza sativa*) interagiert (Jia et al., 2000). Allerdings wurden nur wenige direkte Avr/R-Interaktionen bestätigt, weshalb sich die sogenannte ‚guard‘-Hypothese entwickelt hat. Diese besagt, dass R-Proteine den zugehörigen Effektor nicht direkt sondern indirekt

erkennen, indem sie die Zielproteine der Effektoren kontrollieren oder Effektor-generierte enzymatische Produkte detektieren (van der Biezen et al., 1998; van der Hoorn et al., 2002; Bernoux et al., 2011). Ein Beispiel hierfür ist das in *Arabidopsis thaliana* identifizierte Protein RIN4, welches durch Interaktion mit den drei verschiedenen *P. syringae* Effektoren AvrB, AvrRpm1 und AvrRpt2 modifiziert wird. Diese Veränderung von RIN4 wird durch die beiden R-Proteine RPM1 und RPS2 erkannt, was in der Aktivierung von Abwehrmechanismen resultiert und zur ETI führt (Mackey et al., 2002; Mackey et al., 2003). Aufgrund des hohen Selektionsdrucks solcher Zielproteine hat sich dieses Modell zur sogenannten ‚decoy‘-Hypothese weiterentwickelt, bei der Pflanzen im Verlauf der Evolution neben dem eigentlichen Zielprotein duplizierte oder neue Proteine mit gleicher Funktion anreichern, welche die Maskierung des Zielproteins zur Aufgabe haben (van der Hoorn und Kamoun, 2008; Bernoux et al., 2011). Dies verdeutlicht das ‚evolutionary arms race‘, ein in der Co-Evolution von Pflanze und Pathogen bestehendes ‚Wettrüsten‘ gegeneinander, woraus ständig neue Virulenz- und Avirulenzfaktoren entstehen und sich diverse Infektionsstrategien entwickelt haben (Abb. 2) (Birch et al., 2006; Jones und Dangl, 2006).

Die induzierten Abwehrmechanismen einer ETI sind vergleichbar mit denen der basalen Immunreaktionen, finden jedoch in wesentlich stärkerer Form statt (Abb. 2).

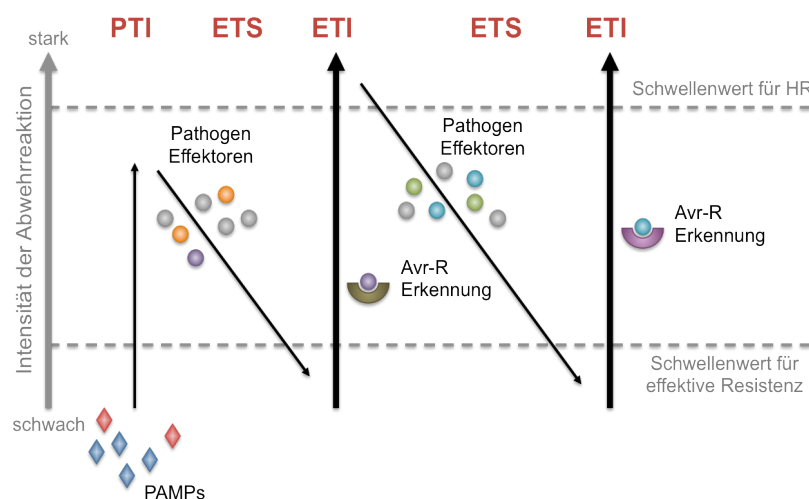


Abb. 2: Model zum quantitativen Output der pflanzlichen Abwehrreaktionen. Das mehrphasige Model verdeutlicht die Intensität der pflanzlichen Abwehrreaktionen als Antwort auf PAMP-Perzeption bzw. Effektor-Erkennung. Gleichzeitig wird das ‚evolutionary arms race‘ gezeigt, wodurch stetig neue Virulenz- und Avirulenzfaktoren entstehen. Details, siehe Text. Modifiziert nach Jones und Dangl, 2006.

Durch die Beteiligung und Aktivierung von SA und SA-abhängiger Signalwege kommt es zur starken Expression von PR-Genen, der Synthese von phenolischen Substanzen und Phytoalexinen, der verstärkten Deposition von Callose und Lignin, sowie einer vermehrten Produktion von ROS. Diese Abwehrkomponenten, die zusammengefasst eine hypersensitive Antwort (HR; *hypersensitive response*) definieren (Morel und Dangl, 1997; Heath, 2000; Greenberg und Yao, 2004; Schulze-Lefert, 2004; Glazebrook, 2005; Jones und Dangl, 2006; O’Connell und Panstruga, 2006), führen zu programmiertem Zelltod an

der Infektionsstelle, wodurch das Pathogen aktiv durch die Produktion antimikrobieller Substanzen, sowie passiv durch das Entziehen der Nährstoffquelle eliminiert werden kann. Umliegendes Pflanzengewebe bleibt hierbei intakt (Heath, 2000; Coll et al., 2011).

Gegenüber nekrotrophen Pflanzenpathogenen wären solche Abwehrreaktionen hingegen förderlich. Deshalb werden hier Signalwege aktiviert die Jasmonsäure- (JA; *jasmonic acid*) und Ethylen-abhängig sind. Diese resultieren in der Synthese von hydrolytischen Enzymen, wie beispielsweise Chitinasen und Glucanasen, sowie der vermehrten Produktion von Sekundärmetaboliten, wie Terpenen, Alkaloiden und Phenylpropanoiden, die toxisch auf das eindringende Pathogen wirken und somit dessen Ausbreitung verhindern (Gundlach et al., 1992; Memelink et al., 2001; Glazebrook, 2005).

Die Anreicherung von Phytohormonen wie SA, JA und Ethylen spielt auch eine große Rolle bei einer systemisch angeeigneten Resistenz (SAR; *systemic acquired resistance*). Hier werden auf Basis einer lokalen Immunantwort nach Pathogenbefall umliegende und auch weiter entfernt liegende Gewebe und Organe auf eine mögliche Pathogenattacke vorbereitet. Durch sogenanntes ‚*priming*‘ können diese gezielte Abwehrmechanismen frühzeitig aktivieren, wodurch eine erhöhte Resistenz gegenüber nachfolgenden Infektionsversuchen besteht (Grant und Lamb, 2006; Shah, 2009).

1.2.1 Die Rolle des ‚*oxidative burst*‘ während der Pflanzenabwehr

Eine der zentralen Komponenten der pflanzlichen Immunabwehr ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die sowohl an der PTI beteiligt sind, als auch eine Schlüsselkomponente der ETI darstellen. Während sie hierbei einerseits an der mechanischen Stabilisierung der Zellwand durch Papillenbildung eine Rolle spielen, können sie andererseits durch oxidative Angriffe Proteine, Lipide und Nukleinsäuren des eindringenden Pathogens schädigen und dadurch auch direkt toxisch wirken (Mehdy, 1994; Apel und Hirt, 2004). Gleichzeitig fungieren sie als wichtige ‚*second messenger*‘ für weitere SA-induzierte Abwehrprozesse und bilden dabei eine positive Rückkopplung zwischen SA-Akkumulation und ROS-Produktion (Vlot et al., 2009). Die rapide Anreicherung von ROS während der Immunantwort, insbesondere von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird als ‚*oxidative burst*‘ bezeichnet und ist durch zwei Phasen charakterisiert die mit PTI und ETI einhergehen (Lamb und Dixon, 1997).

Phase I beschreibt hierbei die Induktion der ROS-Produktion wenige Minuten nach PAMP- / MAMP-Perzeption. Diese relativ schwache Reaktion wird durch die bereits im Apoplasten vorhandenen Enzyme zur ROS-Produktion katalysiert, während parallel die Synthese zusätzlicher Enzyme induziert wird (Apostol et al., 1989; Mehdy, 1994; Lamb und Dixon, 1997; Daudi et al., 2012). Bereits nach ca. 1 Stunde neutralisiert sich der frühe

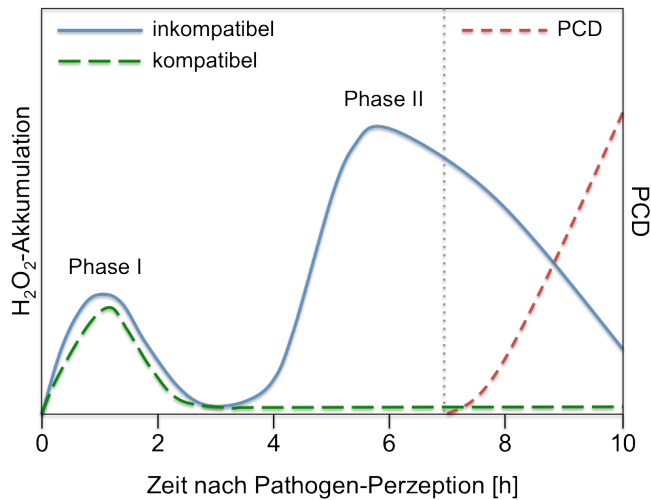


Abb. 3: Repräsentative Kinetik der H₂O₂-Akkumulation während des 'oxidative burst' als pflanzliche Abwehrreaktion. Zeitliche Darstellung der H₂O₂-Akkumulation nach Perzeption eines kompatiblen (grüne Linie) bzw. inkompatiblen (blaue Linie) Pathogens. Nach der unspezifisch erfolgenden Phase I kann das virulente Pathogen die Phase II des 'oxidative burst' effizient unterdrücken, während die starke H₂O₂-Akkumulation in Folge der Infektion mit dem avirulenten Pathogen zur Induktion von PCD (rote Linie) und der erfolgreichen Abwehr des Pathogens führt.

Modifiziert nach Lamb und Dixon, 1997.

'burst' und die ROS-Konzentration nimmt wieder ab, wodurch die Induktion von programmiertem Zelltod ausbleibt (Abb. 3) (Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997). Handelt es sich jedoch um eine inkompatible Interaktion aufgrund einer Avr/R-Interaktion oder einer Nicht-Wirt-Beziehung (NHI; *non-host interaction*), so kommt es ca. 3 Stunden nach Pathogenerkennung zu einem weiteren, als Phase II bezeichneten 'burst'. Dieser zweite 'burst' kennzeichnet sich durch eine massivere und länger anhaltende ROS-Produktion (Abb. 3). Die daraus resultierende HR führt letztendlich zu PCD im infizierten Gewebe und somit zur Abwehr des nicht-adaptierten Pathogens (Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997; Torres et al., 2006).

1.3 Programmierter Zelltod als Überlebensstrategie für Tiere und Pflanzen

Neben seiner Funktion während der pflanzlichen Immunabwehr spielt PCD auch eine wichtige Rolle bei diversen entwicklungsspezifischen Prozessen. Da dies für Pflanzen und Tiere gleichermaßen gültig ist, beschreibt PCD einen essentiellen, physiologischen Mechanismus zur regulierten Eliminierung von Zellen in allen vielzelligen Organismen (Baehrecke et al., 2002). Während in tierischen Systemen Apoptose und Autophagie beschrieben sind, werden PCD-Mechanismen in Pflanzen kontrovers diskutiert, da hier eine definierte Abgrenzung in Anlehnung an die Vorgänge in tierischen Zellen nicht möglich ist.

1.3.1 Mechanismen der Zelltod-Induktion in tierischen Systemen

In tierischen Systemen werden aufgrund von morphologischen Charakteristika generell drei verschiedene Arten von Zelltod beschrieben: Apoptose, Autophagie und Nekrose. Während Apoptose und Autophagie als physiologische Zelltodarten kontrolliert werden können, bildet die Nekrose das Gegenteil zu PCD, da es sich um eine passive,

unkontrollierte und pathologische Zelltodart handelt (Kroemer et al., 2009). Hierbei kommt es aufgrund eines Schadens zum Ausfall der zellulären Ionenpumpen, was in osmotischem Wassereinstrom resultiert. Dadurch schwellen Organellen und Zelle an, es kommt zur Ruptur der Plasmamembran und zum Austreten des Zellinhalts, was wiederum zur Aktivierung des Immunsystems führt und eine Entzündungsreaktion im angrenzenden Gewebe auslöst (Leist und Jäätelä, 2001; Golstein et al., 2003).

Charakteristische Merkmale für apoptotischen Zelltod (Typ-I-PCD) sind die Kondensierung des Chromatins, das Schrumpfen der Zelle und der gerichtete Abbau der DNA in Fragmente spezifischer Größe, was zu typischem DNA ‚*laddering*‘ führt. Hinzu kommt das sogenannte ‚*membrane blebbing*‘, eine Art Blasenbildung der Cytoplasmamembran, und das Entstehen spezifischer apoptotischer Körperchen, die von angrenzenden Zellen aufgenommen und degradiert werden (Vaux und Strasser, 1996; Hengartner, 2000; Potten und Wilson, 2004). Zentrale molekulare Komponenten sind hierbei die Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*), eine Gruppe von Aspartat-spezifischen Cysteinproteasen, die Peptidbindungen C-terminal der Aminosäure Aspartat spalten. Diese können durch den extrinsischen ‚*death receptor pathway*‘ oder über den intrinsischen Weg aktiviert werden (Hengartner, 2000). Beim extrinsischen Weg bindet ein pro-apoptotischer Agonist an einen speziellen, in der Cytoplasmamembran lokalisierten Rezeptor, wodurch eine definierte Caspase-Kaskade ausgelöst wird, die zu PCD führt (Hengartner, 2000). Der intrinsische Weg wird hingegen in Folge von Stresssignalen, wie beispielsweise oxidativem Stress, ER-Stress oder Pathogenattacken, aktiviert. Die Zelltod-Induktion beruht auf einem Mitochondrium-basierten Kontrollmechanismus (Kroemer et al., 2007; Galluzzi et al., 2012) und es kommt zur Aktivierung von Proteinen der Bcl-2 Familie, einer Gruppe von regulatorischen Proteinen, die sowohl aus pro-, als auch aus anti-apoptotischen Faktoren besteht (Gross et al., 1999; Hengartner, 2000; Jan et al., 2008). Durch Proteine die aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Cytoplasma entlassen werden, kommt es unter anderem zur Ausbildung des sogenannten Apoptosoms, wodurch die Zelltod-induzierende Caspase-Kaskade aktiviert wird (Li et al., 1997; Rodriguez und Lazebnik, 1999; Chai et al., 2000; Degterev et al., 2001; Antonsson, 2004; Kim et al., 2005; Billen et al., 2007; Wang und Youle, 2009). Gleichzeitig werden Nukleasen in den Zellkern transloziert, wo sie die Fragmentierung der DNA vermitteln (Susin et al., 1999; Li et al., 2001; Bajt et al., 2006). Somit kommt es zur simultanen Aktivierung verschiedener zellulärer Vorgänge die zusammengenommen in apoptotischem Zelltod resultieren. Die detaillierten molekularen Abläufe unter Kennzeichnung der beteiligten Komponenten sind in Abb. 4 zusammengefasst.

Autophagie beschreibt hingegen einen basalen, katabolischen Prozess, bei dem Zellbestandteile mittels der lysosomalen Degradationsmaschinerie kontrolliert abgebaut

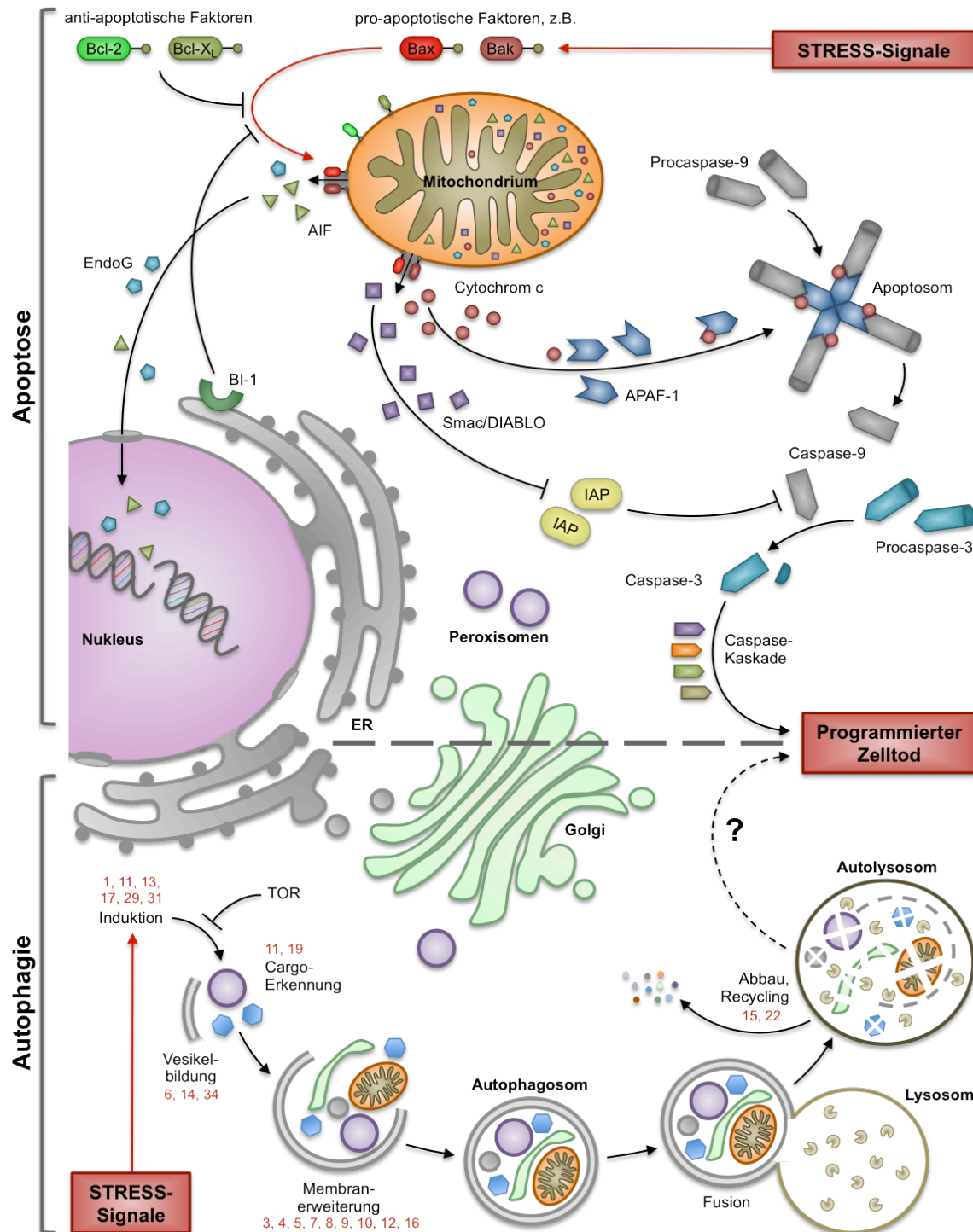


Abb. 4: Detaillierte schematische Zusammenfassung der molekularen Mechanismen während Apoptose und Autophagie in Tieren. Die Zelltod-Induktion durch den intrinsischen apoptotischen Weg beruht auf einem Mitochondrium-basierten Kontrollmechanismus. Durch die Aktivierung werden diverse Signalmoleküle aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Cytoplasma entlassen. Dadurch kommt es zur Formation des Apoptosoms und der Aktivierung der spezifischen Caspase-Kaskade, die in PCD resultiert. Gleichzeitig werden Nucleasen in den Zellkern transloziert, wodurch die Fragmentierung der DNA initiiert wird. Diese Vorgänge können an mehreren Punkten inhibiert werden. (Makro-) Autophagie ist unter Beteiligung spezifischer Atg-Proteine (rote Zahlen) durch verschiedene Einzelschritte gekennzeichnet. Zellbestandteile werden mittels Autophagosomen gezielt zum Abbau delegiert und Makromoleküle wiederverwertet. Die genaue Rolle von Autophagie bei PCD konnte noch nicht hinreichend geklärt werden. AIF, *apoptosis-inducing factor*; APAF-1, *apoptosis-activating factor-1*; BI-1, Bax Inhibitor-1; EndoG, Endonuclease G; ER, endoplasmatisches Retikulum; IAPs, *inhibitors of apoptosis*; TOR, Autophagie-Inhibitor (*target of rapamycin*).

und deren Makromoleküle ‚recycled‘ werden (Levine und Klionsky, 2004; He und Klionsky, 2009). Hierbei handelt es sich um einen konservierten Mechanismus eukaryotischer Zellen, bei dem zwischen Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelter Autophagie unterschieden werden kann (Massey et al., 2004; Klionsky, 2005). Während bei Chaperon-vermittelter Autophagie einzelne, lösliche Proteine direkt ins Lumen des Lysosoms transloziert werden, wird bei Mikroautophagie der Einschluss von cytoplasmatischem Material über direkte Invagination der lysosomalen Membran vermittelt (Reggiori und Klionsky, 2002; Massey et al., 2004; Arias und Cuervo, 2011; Mizushima et al., 2011). Hingegen werden bei Makroautophagie, der häufigsten Form und im weiteren Verlauf als Autophagie bezeichnet, abzubauenen Komponenten in ein *de novo* geformtes Doppelmembran-Vesikel verpackt, dem sogenannten Autophagosom. Über die äußere Membran fusioniert dieses mit dem Lysosom, wodurch das Autolysosom entsteht, wo zunächst die verbliebene Membran und anschließend der Inhalt degradiert wird (Reggiori und Klionsky, 2002; Levine und Klionsky, 2004; He und Klionsky, 2009; Mizushima et al., 2011). Durch genetische Studien in *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass diese Prozesse durch eine Reihe von ATG (*autophagy-related*)-Genen vermittelt werden (Klionsky et al., 2003; Huang und Klionsky, 2007; Mizushima et al., 2011). Entsprechende Orthologe konnten auch in anderen Eukaryoten identifiziert werden (Yorimitsu und Klionsky, 2005; Xie und Klionsky, 2007). Eine Übersicht der einzelnen Vorgänge unter Beteiligung der zugehörigen Atg-Proteine ist in Abb. 4 zusammengefasst. Neben der basalen Aktivität kann Autophagie unter bestimmten Bedingungen induziert werden. Hierzu zählen Entwicklungsprozesse wie Zelldifferenzierung, Stresssituationen wie Hitze-, Salz- oder oxidativer Stress, sowie Nährstoff-limitierende Bedingungen (Levine und Klionsky, 2004). Gleichzeitig ist Autophagie Teil des funktionellen Immunsystems und kann beispielsweise intrazelluläre Pathogene eliminieren (Levine und Deretic, 2007). Da sterbende Zellen oftmals Charakteristika von Autophagie zeigen wird ‚*autophagic cell death*‘ auch als Form des PCD (Typ-II-PCD) beschrieben (Levine und Yuan, 2005). Allerdings hat Autophagie neben der ‚*pro-death*‘ auch die genannten ‚*pro-survival*‘ Funktionen, wodurch die genaue Rolle von Autophagie während PCD sehr kontrovers diskutiert wird und noch nicht hinreichend aufgeklärt werden konnte (Kroemer und Levine, 2008; Denton et al., 2012).

1.3.2 Programmierter Zelltod in Pflanzen

Die essentielle Funktion von PCD in Pflanzen ist unumstritten. Zwar zeigen sich eindeutige Parallelen, eine stringente Unterteilung der ablaufenden Vorgänge in Autophagie und Apoptose ist jedoch aufgrund diverser Unterschiede nicht möglich.

Genau wie in tierischen Systemen dient der physiologische Prozess der Autophagie in Pflanzen ebenfalls hauptsächlich der Remobilisierung von Nährstoffen unter Kohlenstoff- und Stickstoff-limitierenden Bedingungen, sowie generellen Wachstums- und Entwicklungsschritten, wie zum Beispiel der Differenzierung des vaskulären Systems oder der Blattseneszenz (Bassham, 2007). Gleichzeitig spielt Autophagie ebenfalls eine große Rolle bei Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen (Liu et al., 2005; Seay et al., 2006; Hofius et al., 2009; Hofius et al., 2011) und der dadurch induzierte PCD zeigt viele morphologische Charakteristika der Autophagie (Bassham, 2007). Allerdings ist auch hier bislang unklar welche Rolle Autophagie in diesen Prozessen genau einnimmt. Ähnlich wie in Metazoa scheint es auch bei Pflanzen sowohl vom Pathosystem, als auch vom infizierten Gewebe und dessen Alter abzuhängen ob Autophagie eine ‚*pro-survival*‘ oder ‚*pro-death*‘ Funktion hat (Hofius et al., 2011). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivierung des N-Resistenzgens in Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) durch die Helikase p50 des Tabak-Mosaik-Virus (TMV) zu HR-induziertem Zelltod führt. Interessanterweise resultiert eine TMV-Infektion in Beclin1-*silencing* Pflanzen nicht nur in einer lokalen Zelltodantwort, sondern führt auch zum Absterben des umliegenden, nicht-infizierten Gewebes. Somit übernimmt Autophagie durch die Eingrenzung des HR-induzierten Zelltods eine zellschützende Funktion (Liu et al., 2005; Seay et al., 2006). Im Gegensatz hierzu führt das genetische Ausschalten von verschiedenen ATG-Genen in *A. thaliana* zur Suppression von HR-induziertem Zelltod als Antwort auf die Avr/R-Interaktion des *P. syringae* Effektors AvrRps1 mit RPS1, einem NB-LRR-Rezeptor der in Abhängigkeit des Abwehrregulators EDS1 Autophagie induziert. Das Ausschalten der Autophagie-Maschinerie hat somit in diesem Fall einen negativen Effekt auf die Zelltod-Antwort und Autophagie fungiert ‚*pro-death*‘ (Hofius et al., 2009).

PCD in Pflanzen zeigt aber auch diverse Merkmale von apoptotischem Zelltod, wie Chromatinkondensierung, Zellkernfragmentierung und Schrumpfen der Zellen (Wang et al., 1996; Maraschin et al., 2005). Zudem spielt das Mitochondrium ebenfalls eine entscheidende Rolle, da dessen funktionelle Störung und die Freigabe von Cytochrom c ins Cytoplasma auch hier bei entwicklungsspezifischem und Stress-vermitteltem PCD beobachtet werden kann (Reape et al., 2008; Reape und McCabe, 2008). Zwar fehlen Pflanzen Homologe der Bcl-2-Proteinfamilie, es konnte jedoch gezeigt werden, dass transgene Expression von Bax HR-ähnlichen PCD in Tabak hervorruft und dass die Anwesenheit von anti-apoptotischen Faktoren, wie Bcl-2, induzierten Zelltod durch nekrotrophe Pathogene verhindern kann (Lacomme und Santa Cruz, 1999; Dickman et al., 2001). Gleichzeitig wurden Homologe von DAPs (*death associated proteins*), AIF (*apoptosis inducing factor*) und BAG-Proteinen (*Bcl-2-associated athanogene*) identifiziert (Lorenzo et al., 1999; Lam et al., 2001; Candé et al., 2002; Doukhanina et al., 2006; Lord

und Gunawardena, 2012). Trotz der vollständigen Sequenzierung diverser Pflanzengenome konnten bislang keine Caspasen identifiziert werden. Jedoch wurden zwei Gruppen Caspase-ähnlicher Proteasen (CLPs; *caspase-like proteases*) beschrieben, für die Caspase-ähnliche Funktionen gezeigt werden konnten: Cystein-Endopeptidasen, welche Metacaspasen und ‚*vacuolar processing enzymes*‘ (VPEs) umfassen (Uren et al., 2000; Hatsugai et al., 2004; Hara-Nishimura et al., 2005; Xu und Zhang, 2009; Bozhkov et al., 2010), sowie Serin-Endopeptidasen, zu denen Saspasen und Phytaspasen zählen (Rojo et al., 2004; Coffeen und Wolpert, 2004; Chichkova et al., 2010; Vartapetian et al., 2011). Dennoch kann man bei Pflanzen nicht von apoptotischem Zelltod sprechen, da zusätzlich das Fehlen eines aktiven Phagozytose-Systems, sowie das Vorhandensein der pflanzlichen Zellwand, eine klassische Apoptose verhindern (Williams und Dickman, 2008; van Doorn et al., 2011).

Um eine klarere Abgrenzung der verschiedenen Arten von PCD in Pflanzen zu ermöglichen wurde eine Klassifizierung anhand morphologischer Kriterien vorgeschlagen, bei der zwei Arten von PCD definiert wurden: vakuolärer Zelltod (*vacuolar cell death*; VCD) und nekrotischer Zelltod (*necrotic cell death*; NCD) (van Doorn et al., 2011). VCD beschreibt hierbei den Abbau des Zellinhaltes über ‚lytische Vakuolen‘ mit folgender Tonoplast-Ruptur und der massiven Freigabe von Hydrolasen, welche die verbleibenden Zellbestandteile abbauen. NCD definiert sich hingegen durch anschwellen der Mitochondrien, einer frühen Ruptur der Plasmamembran, sowie das Fehlen der lytischen Vakuolen. Allerdings wird eingeräumt, dass HR-induzierter Zelltod nach Pathogenattacke oftmals Charakteristika beider PCD-Klassen aufzeigt und somit als eigenständige Zelltod-Modalität anzusehen ist (van Doorn et al., 2011).

1.3.3 BI-1, ein konservierter Zelltod-Suppressor

Trotz großer Unterschiede zwischen tierischem und pflanzlichem Zelltod, konnten Regulatorproteine identifiziert werden, die PCD sowohl in Metazoa, als auch in Pflanzen kontrollieren können. Hierzu gehört das ER-Transmembranprotein Bax Inhibitor-1 (BI-1). Dieses wurde bei Untersuchungen identifiziert Bax-induzierten Zelltod in Hefe zu supprimieren und konnte als Kandidatengen aus einer humanen cDNA-Bank isoliert werden (Xu und Reed, 1998). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Überexpression dieses Gens Resistenz gegenüber verschiedener apoptotischer Stimuli des intrinsischen Signalwegs vermittelt und gegenteilig das genetische Ausschalten der Expression zu Apoptose in Krebszelllinien führt (Xu und Reed, 1998). BI-1 fungiert somit als Regulatorprotein von apoptotischem Zelltod (Xu und Reed, 1998; Hückelhoven et al., 2004; Watanabe und Lam, 2009; Ishikawa et al., 2011).

In Reis (*Oryza sativa*) und *A. thaliana* konnten ebenfalls BI-1 codierende Gene identifiziert werden, deren jeweilige Überexpression zur Suppression von Bax-induziertem Zelltod in Hefe- und Pflanzenzellen führt (Kawai et al., 1999; Kawai-Yamada et al., 2001). Die Zelltod-supprimierende Funktion von BI-1 ist demnach in Tieren und Pflanzen konserviert. Zudem wurde in diversen Pflanzensystemen gezeigt, dass die transgene Überexpression von *BI-1* zur Suppression oder Verminderung von PCD führt. Dies gilt für PCD sowohl durch abiotische als auch durch biotische Stressfaktoren (Chae et al., 2003; Matsumura et al., 2003; Watanabe und Lam, 2006; Babaeizad et al., 2009; Isbat et al., 2009). So spielt BI-1 auch eine wichtige Rolle bei Pathogenattacken und der damit verbundenen HR-Antwort und ist beispielsweise an der HR-vermittelten Resistenz von *A. thaliana* gegenüber *P. syringae* und Weizen (*Triticum aestivum*) gegenüber *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* beteiligt (Kawai-Yamada et al., 2009; Wang et al., 2012).

Auch in Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde ein BI-1 Homolog (HvBI-1) identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass auch hier die Genexpression im Zusammenhang mit einer Pathogenattacke induziert wird (Hückelhoven et al., 2001). Durch seine Zelltod-supprimierende Funktion dient HvBI-1 als Suszeptibilitätsfaktor gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Gerstenmehltau) und wird dadurch für die vollständige Kompatibilität benötigt (Eichmann et al., 2010). Durch Überexpression von *HvBI-1* kommt es dementsprechend zur Hypersuszeptibilität gegenüber Gerstenmehltau, sowie zur erfolgreichen Penetration durch das ‚non-host‘ Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Weizenmehltau) (Eichmann et al., 2004; Babaeizad et al., 2009). Gleichzeitig zeigt sich eine partielle Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Fusarium graminearum* (Babaeizad et al., 2009) und in Pflanzen, bei denen der negative Abwehr- und Zelltod-regulator MLO fehlt, wird die dadurch hervorgerufene Penetrationsresistenz gegenüber Gerstenmehltau aufgehoben (Hückelhoven et al., 2003). Somit ist BI-1 auch in Gerste ein zentraler Regulator von programmiertem Zelltod.

1.4 Phytopathogene Brandpilze

Die etwa 1500 Arten umfassende Gruppe der Brandpilze (Ustilaginomycotina) gehört zu den Basidiomyceten und besteht überwiegend aus Pflanzenpathogenen, die eine Vielzahl verschiedener ein- und zweikeimblättriger Pflanzen befallen (Bauer et al., 2006; Begerow et al., 2006). Charakteristisch für phytopathogene Brandpilze ist die Infektion durch ein dikaryotisches Filament, welches aus der Fusion zweier haploider Sporidien hervorgeht (Bakkeren et al., 2008) und zur Ausbildung von dunklen, melanisierten Teliosporen im infizierten Pflanzengewebe führt, welche nach der Sporenreife freigesetzt werden.

Dadurch kommt es zum typisch verbrannten Aussehen der Wirtspflanze, woraus sich der wissenschaftliche Name dieser Gruppe ableitet (lat. *ustilare*; verbrennen).

Aufgrund des verursachten Ernteausfalls bei der jeweiligen Wirtspflanze sind vor allem *Ustilago maydis* (Mais), *Ustilago tritici* (Weizen), *Ustilago nuda* (Gerste), *Ustilago avenae* (Hafer) und *Ustilago hordei* (Gerste und Hafer), sowie *Sporisorium reilianum* (Mais und Hirse) und *Sporisorium scitamineum* (Zuckerrohr) von ökonomischer Relevanz. Dementsprechend besteht ein großes Interesse am Verständnis der Infektionsprozesse und möglicher Präventionsstrategien, wie der Züchtung resistenter Kultivare. (Mathre, 1997; Martínez-Espinoza et al., 2002). Einige Arten konnten jedoch als molekulare Modellorganismen etabliert werden und dienen der Untersuchung fundamentaler und biologisch relevanter Fragestellungen.

1.4.1 Die Modellsysteme *Ustilago maydis* und *Ustilago hordei*

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrands, ist als fakultativ biotropher Heterobasidiomycet zur Vollendung seines Lebenszyklus auf lebendes Pflanzengewebe angewiesen. Hierfür etabliert er eine spezifische Interaktion mit der Wirtspflanze die bis zur Sporulation aufrechterhalten wird. Das sehr enge und spezifische Wirtsspektrum beschränkt sich neben der Kulturpflanze Mais (*Zea mays*) lediglich auf Teosinte (*Zea mays* spp. *mexicana* und spp. *parvigluminis*), die putative Urform von Mais (Doebley, 1992). Der durch Infektion mit *U. maydis* hervorgerufene Maisbeulenbrand resultiert nach leichten Chlorosen mit einhergehender Anthocyanbildung in großen, generell als ‚Tumore‘ bezeichneten Pflanzengallen, die an allen oberirdischen Pflanzenteilen gebildet werden können, in der Natur jedoch vornehmlich in den männlichen und weiblichen Blütenständen auftreten (Abb. 5 A und B) (Kahmann et al., 2000; Brefort et al., 2009). Diese gelten in Mexiko als traditionelle Delikatesse (Juarez-Montiel et al., 2011).

Der Hartbranderreger *Ustilago hordei* infiziert sowohl Gerste (*Hordeum* spp.), als auch Hafer (*Avena* spp.) und ist somit in der Lage zwei verschiedene Gattungen der Familie

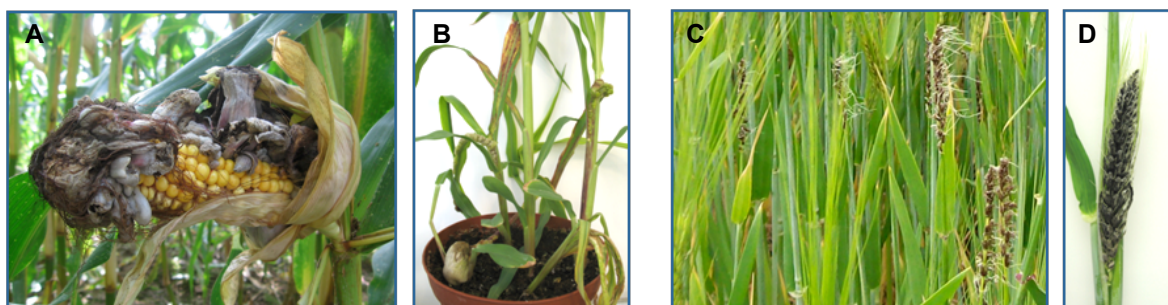


Abb. 5: Symptome nach *U. maydis*- und *U. hordei*-Infektion. A-B, Durch Infektion mit *U. maydis* verursachte Tumorbildung am weiblichen Blütenstand (A, im Freiland; R. Rösser) und an Spross und Blättern (B, unter Laborbedingungen); C-D, Durch Teliosporen ersetzte Blütenanlagen mit *U. hordei* infizierter Gerstenpflanzen (C, im Freiland; D, unter Laborbedingungen).

der Süßgräser (Poaceae) zu parasitieren. Es handelt sich ebenfalls um einen fakultativ biotrophen Heterobasidiomyceten, doch anders als bei *U. maydis*, verläuft eine Infektion mit *U. hordei* systemisch und zunächst ohne sichtbare Symptome (Bakkeren und Kronstad, 1993; Hu et al., 2002; Linning et al., 2004). Zwar breitet sich *U. hordei* im meristematischen Gewebe aus, erkennbar wird die Infektion jedoch erst zur Blühreife, denn die Sporulation des Pilzes erfolgt parallel zur Differenzierung des Infloreszenzmeristems, sodass die reproduktiven Blütenanlagen der Pflanze durch schwarze Teliosporen ersetzt werden (Abb. 5 C und D) (Hu et al., 2002).

Ustilago maydis ist ein etablierter molekularbiologischer Modellorganismus für genetische, zellbiologische und phytopathologische Fragestellungen (Kahmann et al., 2000; Martínez-Espinoza et al., 2002; Steinberg und Perez-Martin, 2008; Brefort et al., 2009; Djamei und Kahmann, 2012) und auch *U. hordei* eignet sich als Modellsystem, wurde jedoch bislang weniger spezifisch untersucht. Bei beiden Pathogenen lassen sich die haploiden Sporidien der saprophytischen Wachstumsform in axenischer Kultur und auf diversen Festmedien kultivieren und die kompletten Lebenszyklen können unter Laborbedingungen in Abhängigkeit der Pflanze durchlaufen werden (Banuett, 1995; Hu et al., 2002). Außerdem verfügen beide Pilze über ein effizientes homologes Rekombinationssystem, welches mittels verschiedener dominanter Selektionsmarker die stabile Transformation ermöglicht (Holliday, 2004; Kämper, 2004; Basse und Steinberg, 2004). Zusätzlich sind die meisten der für *U. maydis* etablierten Methoden direkt oder mit einigen Abwandlungen auf *U. hordei* übertragbar. Die vollständig entschlüsselten Genomsequenzen (Kämper et al., 2006; Laurie et al., 2012) ermöglichen zudem, neben der Identifizierung interessanter Kandidatengene für revers genetische Ansätze über computergestützte *in silico* Analysen, auch den Einsatz der *Microarray*-Technologie und bieten dadurch detaillierte Einblicke in Transkriptom, Metabolom, Sekretom und Effektom (Kämper et al., 2006; Doehlemann et al., 2008a; Mueller et al., 2008; Mathow, 2011). Gleichzeitig besteht dadurch die Möglichkeit in Verbindung mit der Genomsequenz von *S. reilianum* (Schirawski et al., 2010) genauere Erkenntnisse über die Evolution dieser verwandten Arten zu gewinnen, sowie Wirts-spezifische Faktoren zu identifizieren.

Für das *U. maydis*/Mais-Pathosystem konnte zudem bereits gezeigt werden, dass eine Infektion das Umprogrammieren der Maispflanze zugunsten des Pilzes verursacht. Dies führt zu Änderungen des Primär- und Sekundärmetabolismus, Modifikationen der Photosynthese, sowie einer veränderten Hormon-basierten Signaltransduktion. Zudem konnte gezeigt werden, dass es zu einer PAMP-vermittelten Erkennung von *U. maydis* kommt, deren Folgen vom Pilz unterbunden werden (Kämper et al., 2006; Doehlemann et al., 2008a; Doehlemann et al., 2008b; Mueller et al., 2008; Horst et al., 2010a; Horst et al., 2010b; Skibbe et al., 2010). Gleiches ist für das *U. hordei*/Gerste-Pathosystem vorstellbar.

Hier haben *Microarray*-basierte Transkriptomanalysen der frühen Infektionsphase (bis 6 dpi) gezeigt, dass etwa die Hälfte aller annotierten Gene differentiell reguliert ist. Insbesondere metabolische Prozesse, sowie die Sekretion von Proteinen zeigen dabei eine Stadien-spezifische Regulation. So verwertet *U. hordei* beispielsweise bei Appressorienbildung und Penetration vorhandene Energiereserven, während in den folgenden Stadien zunehmend die Expression von Zucker-, Stickstoff-, Phosphat- und Schwefeltransportern induziert wird, um die Nährstoffversorgung des Pilzes in der Pflanze zu gewährleisten (Mathow, 2011). Unter den 261 differenziell regulierten sekretierten Proteinen finden sich vor allem in frühen Stadien viele hydrolytische Enzyme, die am Penetrationsmechanismus beteiligt sind und den Abbau Wirts-spezifischer Komponenten vermitteln. Gleichzeitig finden sich hier aber auch 196 mehr als 2-fach induzierte Gene, deren sekretiertem Genprodukt keine potentielle Funktion zugewiesen werden konnte.

1.4.2 Die Lebenszyklen von *U. maydis* und *U. hordei*

Die Lebenszyklen von *U. maydis* und *U. hordei* sind sich sehr ähnlich. Beide Brandpilze haben einen diphasischen Lebenszyklus, der in eine saprophytische Wachstumsphase und eine biotrophe Wachstumsphase unterteilt ist. Gleichzeitig ist der Lebenszyklus an die sexuelle Reproduktion gekoppelt, wodurch drei verschiedene Kernphasen durchlaufen werden: eine haploide, eine dikaryotische und eine diploide Phase.

Die haploide, saprophytische Phase beginnt mit dem Auskeimen der diploiden Teliosporen, aus denen, nach durchlaufener Meiose, vier haploide Kerne hervorgehen, welche in eine Probasidie einwandern, von der die Sporidien sukzessiv abgeschnürt werden (Abb. 6 A1, B1). Diese ernähren sich anschließend saprophytisch und vermehren sich durch polare Knospung (Abb. 6 A2, B2). Auf der Wirtspflanze sind diese Sporidien in Reinkultur apathogen, denn die infektiöse Form stellt jeweils das dikaryotische Filament dar (Abb. 6 A4, B4). Dieses entsteht wiederum durch die Fusion zweier kompatibler Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps, ein Prozess der durch die beiden Paarungstyp-Loci *a* und *b* kontrolliert wird.

Im tetrapolaren Kreuzungssystem von *U. maydis* codiert der biallelische *a*-Locus, der in den beiden Allelen *a1* und *a2* vorliegt, für ein Pheromon-Rezeptor-System das für die gegenseitige Erkennung der Zellen und deren Fusion verantwortlich ist. Die Pheromon-Erkennung führt zur Aktivierung zweier Signaltransduktionskaskaden (Feldbrügge et al., 2004), wodurch die für die Zellfusion entscheidenden Gene aktiviert werden (Kaffarnik et al., 2003) und die Transkription der *b*-Locus Gene initiiert wird. Dies führt zur Ausbildung von Konjugationshyphen die entlang des Pheromongradienten aufeinander zu wachsen und an der Spitze fusionieren, wodurch das dikaryotische Filament entsteht (Snetselaar

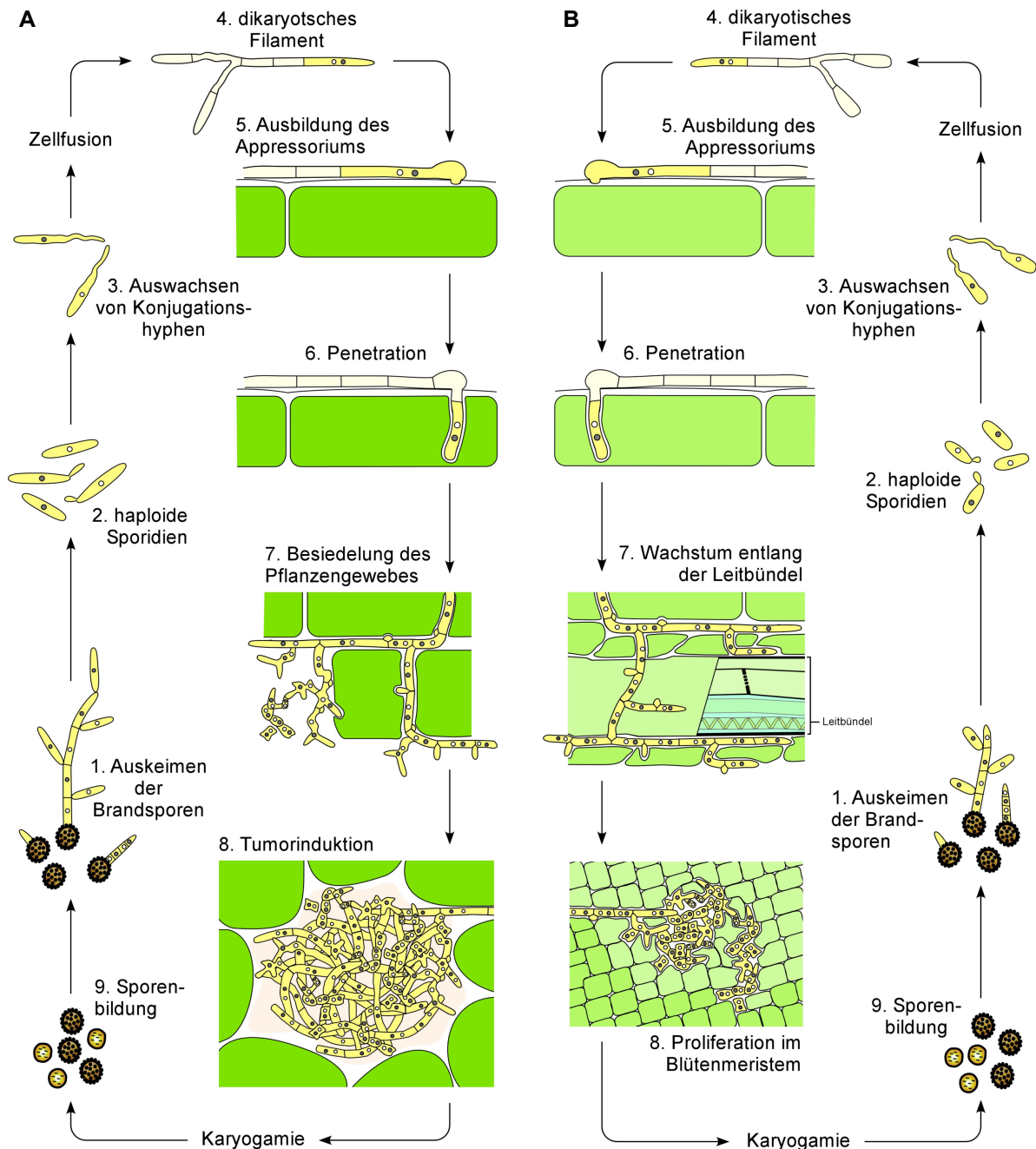


Abb. 6: Die Lebenszyklen von *U. maydis* und *U. hordei*. **A**, Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*. Details, siehe Text; **B**, Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. hordei*. Details, siehe Text; in beiden Fällen sind die unterschiedlichen Paarungstypocli der haploiden Sporidien durch weiße, bzw. durch schwarze Zellkerne dargestellt.

und Mims, 1992). Der in *U. maydis* multiallelisch vorliegende *b*-Locus (Rowell und DeVay, 1954) ist für die Aufrechterhaltung des dikaryotischen Filaments, sowie die folgende pathogene Entwicklung verantwortlich und codiert für die beiden Homeodomänenproteine bEast (bE) und bWest (bW). Fusionieren zwei Sporidien mit unterschiedlichen *b*-Allelen bildet sich ein bE/bW-Heterodimer, welches für die folgende pathogene Entwicklung essentiell ist (Kämper et al., 1995; Brachmann et al., 2001; Banuett, 2007). ‚Mating‘ in *U. hordei* unterliegt den gleichen molekularen Prozessen, basiert allerdings auf einem

bipolaren Kreuzungssystem. Hierbei gibt es nur einen Kreuzungslocus (*MAT*) in dem die beiden Paarungstyp-Loci *a* und *b* physisch und genetisch gekoppelt sind, sodass nur zwei Allelspezifitäten existieren, *MAT-1* mit *a1* und *b1*, sowie *MAT-2* mit *a2* und *b2* (Bakkeren und Kronstad, 1993; Bakkeren und Kronstad, 1994). Dadurch sichert jedes Konjugationsereignis die Bildung eines dikaryotischen Filaments (Bakkeren und Kronstad, 2007).

Durch spezifische Stimuli auf der Pflanzenoberfläche wird die Ausbildung eines Appressoriums initiiert (Abb. 6 A5, B5), einer terminalen Verdickung der Hyphenspitze durch die eine direkte Penetration des Gewebes erfolgt (Snetselaar und Mims, 1992; Hu et al., 2002). Mit der Penetration wird die biotrophe Interaktion mit der Wirtspflanze etabliert und es kommt zu intrazellulärem Wachstum im Wirtsgewebe, wobei sich die Plasmamembran der Wirtszellen einstülpt und die Hyphe vollständig ummantelt (Abb. 6 A6, B6). In späteren Stadien erfolgt anschließend primär interzelluläres Wachstum (Snetselaar und Mims, 1992; Hu et al., 2002).

Bei Maispflanzen lassen sich bereits nach zwei bis drei Tagen die ersten Anzeichen einer *U. maydis* Infektion anhand auftretender Chlorosen und Anthocyanbildung erkennen (Banuett und Herskowitz, 1996), bevor nach etwa fünf Tagen die Tumorbildung einsetzt (Abb. 6 A8), die vermutlich durch *Ustilago*-induzierte Wachstums- und Teilungsstimulation der Pflanzenzellen erfolgt (Snetselaar und Mims, 1994; Doehlemann et al., 2008a). Innerhalb des Tumorgewebes werden sporogene Hyphen gebildet, in denen die Karyogamie stattfindet und woraus im Laufe der Sporenreifung nach Fragmentierung der Hyphen diploide Einzelzellen entstehen. Diese reifen zu ornamentierten, dunkel gefärbten Teliosporen heran (Abb. 6 A9), welche durch Aufplatzen des Tumorgewebes freigegeben werden (Banuett und Herskowitz, 1996). Im Gegensatz hierzu findet die Infektion mit *U. hordei* zunächst ohne äußere Anzeichen statt. Während der frühen Infektionsphase wächst der Pilz in den ersten sechs bis sieben Tagen ohne das Wirtsgewebe zu besiedeln entlang der Leitbündel (Abb. 6 B7) (Kiesling, 1952) zum Wachstumsmeristem, wo er in eine Art Ruhestadium übergeht und keine Zunahme der Pilzbiomasse erfolgt (Hu et al., 2002). Das Signal zur massiven Proliferation des Pilzes gibt möglicherweise die Differenzierung des Wachstumsmeristems zum Infloreszenzmeristem (Abb. 6 B8), welche nach etwa sieben bis acht Wochen stattfindet (Hu et al., 2002). Dadurch werden die Samenanlagen der Pflanze zunächst durch proliferierendes Pilzmyzel, später durch sporogene Hyphen und schließlich durch die differenzierten Teliosporen ersetzt (Hu et al., 2002). Die hervortretende Ähre trägt somit anstelle von Reproduktionsorganen gefüllte Brandsporenlager, die von einer schützenden Membran umgeben sind, welche nach Aufplatzen die Sporen entlässt.

Die Brandsporen können folglich unter geeigneten Bedingungen auskeimen und der Lebenszyklus ist abgeschlossen.

1.5 Sekretierte Effektoren und deren Rolle für Biotrophie und Pathogenität

Um mit der pflanzlichen Immunantwort zu interferieren ist die Sekretion von Effektorproteinen essentiell für alle biotrophen Pathogene. Diese werden anhand ihrer Ziellokalisierung im Wirt in apoplastische und cytoplasmatische Effektoren unterteilt. Apoplastische Effektoren verbleiben nach ihrer Sekretion im interzellulären Raum und interagieren dort mit ihren jeweiligen Zielproteinen, wie beispielsweise Proteasen, oder Zelloberflächenrezeptoren der Pflanze. Cytoplasmatische Effektoren hingegen werden ins pflanzliche Cytoplasma transloziert, wo sie mit cytoplasmatischen Rezeptormolekülen interagieren oder ins jeweilige Zielkompartiment vermittelt werden (Abb. 7) (Kamoun, 2006).

Bakterielle Effektoren, wie von beispielsweise Pseudomonaden oder Xanthomonaden, werden über ein Typ-III-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle injiziert. Hierbei werden diese über einen Nadelkomplex direkt ins Wirtscytoplasma übertragen, wo sie mit den Signaltransduktionskaskaden der pflanzlichen Immunabwehr interferieren oder enzymatische Funktionen aufweisen (He et al., 2004; Ghosh, 2004; Mudgett, 2005; Büttner und Bonas, 2006). Ein Beispiel hierfür ist der *P. syringae* pv. *tomato* Effektor AvrPto. Dieser bindet an die intrazelluläre Kinasedomäne der PRRs FLS2 und EFR, welche für die Erkennung von Flagellin (FLS2) und des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu (EFR) verantwortlich sind. Nach MAMP-Perzeption wird die Signalweiterleitung der Kinasedomäne durch die Bindung von AvrPto gestört, wodurch eine PTI ausbleibt. In resistenten Pflanzen wird AvrPto durch das korrespondierende R-Protein, die Serin/Threonin-Kinase Pto erkannt, es kommt zur Aktivierung des Prf-vermittelten Signalwegs und zur erfolgreichen Induktion der Pflanzenabwehr (Hauck et al., 2003; Xiang et al., 2008; Zong et al., 2008; Xiang et al., 2011). In *Xanthomonas* spp. konnten zudem die sogenannten TAL (*transcription activator-like*) Effektoren identifiziert werden. Diese bilden eine neue Klasse von DNA-bindenden Proteinen, welche die Expression von Pflanzengenen durch Sequenz-spezifische Bindung an Promotorelemente individuell induzieren können (Kay et al., 2007; Römer et al., 2007; Boch et al., 2009; Moscou und Bogdanove, 2009; Boch und Bonas, 2010; Scholze und Boch, 2011).

Phytopathogene Nematoden, wie zum Beispiel *Heterodera* spp., *Globodera* spp. oder *Meloidogyne* spp. sekretieren Effektoren mit ähnlicher Strategie wie Bakterien. Über ein sogenanntes Stilett, einer Art hohlem, ausstreckbarem Stachel, werden die Effektoren direkt in Apoplast oder Cytoplasma injiziert um Abwehr, Genregulation und Metabolismus der Wirtspflanze zu manipulieren (Vanholme et al., 2004; Vieira et al., 2011).

Filamentöse Pilze und Oomyceten sekretieren Effektoren hauptsächlich mittels Exocytose wodurch fast alle bekannten Effektoren ein N-terminales Sekretionssignal aufweisen (O'Connell und Panstruga, 2006; Panstruga und Dodds, 2009). Somit gelangen alle

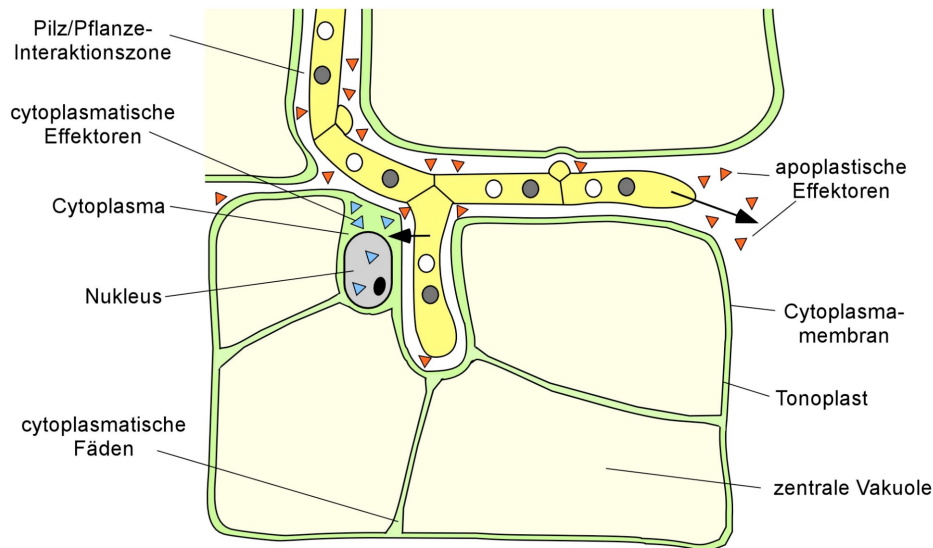


Abb. 7: Schematische Darstellung möglicher Lokalisierungen sekretierter Proteine während der biotrophen Interaktion am Beispiel von *Ustilago* spp. Apoplastische Effektoren (rot) und cytoplasmatische Effektoren (blau) werden von der Pilzhyphe sekretiert. Entsprechend ihrer Ziel- und Wirkungsloci interagieren apoplastische Effektoren anschließend in der Interaktionszone mit anderen apoplastischen Proteinen oder spezifischen Rezeptoren in der Cytoplasmamembran, während cytoplasmatische in die Pflanzenzelle transloziert werden, wo sie im Cytoplasma oder in Zellorganellen aktiv sein können. In Zusammenarbeit mit K. Schipper (Schipper, 2009).

Effektoren primär in die biotrophe Interaktionszone, wo sie dann entweder als apoplastische Effektoren agieren, oder in das pflanzliche Cytoplasma transloziert werden (Abb. 7). Während der Aufnahmeprozess cytoplasmatischer Effektoren für filamentöse Pilze bislang noch nicht aufgeklärt werden konnte, wird für Oomyceten ein Aufnahme-mechanismus mittels eines [RXLR-(D)EER]-Motivs in Betracht gezogen. Dieses Aminosäuresequenzmotiv wird als Translokationsdomäne beschrieben und nutzt möglicherweise die pflanzliche Endocytose für den Import der Effektoren, was jedoch sehr kontrovers diskutiert wird (Whisson et al., 2007; Morgan und Kamoun, 2007; Birch et al., 2008; Dou et al., 2008; Kale et al., 2010; Oliva et al., 2010; Yaeno et al., 2011; Ellis und Dodds, 2011; Bozkurt et al., 2012; Wawra et al., 2012). Dennoch konnte die cytoplasmatische Lokalisation und Funktion für einige Oomyceten-Effektoren bereits beschrieben werden. Ein Beispiel hierfür ist der *Phytophthora infestans* Effektor AVRblb2. Dieser cytoplasmatische Effektor inhibiert die Sekretion von C14, einer pflanzlichen Cysteinprotease, die als Abwehrreaktion auf Pathogenbefall im Apoplasten angereichert wird. Durch die signifikante Reduktion der Protease-Akkumulation und folglich auch der Protease-Aktivität im Apoplasten trägt AVRblb2 zur erhöhten Virulenz von *P. infestans* in suszeptiblen Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) bei (Bozkurt et al., 2011).

Auch für filamentöse Pilze konnte die Funktion einiger Effektoren bereits aufgeklärt werden. Um die pflanzliche Immunabwehr zu umgehen sekretiert *Cladosporium fulvum*, der Erreger der Braunfleckenkrankheit bei Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicon*),

beispielsweise die beiden Effektoren Avr4 und Ecp6. Beide Proteine haben eine maskierende Funktion und binden an Chitin, jedoch mit unterschiedlichen Strategien. Durch eine Chitin-Bindedomäne bindet Avr4 direkt nach der Sekretion an die Pilz-Zellwand um diese vor Abbau durch pflanzliche Chitinasen zu schützen (van den Burg et al., 2004). Um zu verhindern, dass dennoch Chitin-Oligomere erkannt werden, bindet Ecp6 über eine LysM-Domäne mit hoher Affinität an kurze Chitin-Oligomere im Apoplasten, wodurch keine PAMP-Perzeption stattfindet und die Induktion von Abwehrreaktionen ausbleibt (de Jonge und Thomma, 2009; de Jonge et al., 2010). Ein vergleichbarer Mechanismus wurde auch im *M. oryzae*/Reis-Pathosystem gezeigt (Mentlak et al., 2012). Gleichzeitig konnte bereits für mehrere Pathosysteme gezeigt werden, dass die Inhibition apoplastischer Proteasen entscheidend für die Virulenz des jeweiligen Pathogens ist, da diese eine Schlüsselrolle in der Erkennung von Pathogenen spielen (van der Hoorn, 2008). Demnach ist die Überwindung der apoplastischen Immunität für filamentöse Pathogene von besonderer Bedeutung. Da diese in allen Wirtspflanzen aus ähnlichen Komponenten der basalen Immunabwehr besteht, wurde aktuell der Begriff des ‚core effectome‘ vorgeschlagen. Dieses Set aus Effektoren kann beispielsweise durch Chitin-Maskierung, Protease-Inhibition, oder ‚oxidative burst‘-Suppression basale Immunreaktionen unterdrücken und ist demnach in vielen Pathogenen funktionell konserviert (Doehlemann und Hemetsberger, 2013).

Gleichzeitig gibt es auch Effektoren die gezielt programmierten Zelltod unterdrücken können, wie zum Beispiel der *P. syringae* pv. *tomato* Effektor AvrPtoB. Genau wie AvrPto kann in resistenten Tomatenpflanzen auch AvrPtoB durch das R-Protein Pto erkannt werden. Diese Erkennung führt zu einer Interaktion von Pto mit dem LRR-Protein Prf, wodurch es zur Aktivierung der Abwehrmaschinerie und zur Induktion von lokalem PCD kommt. Fen, eine weitere Kinase, kann ebenfalls mit AvrPtoB interagieren und daher nach Interaktion mit Prf, die Induktion von PCD vermitteln. Die C-terminale Domäne von AvrPtoB, eine E3-Ubiquitinligase, sorgt jedoch für die spezifische Ubiquitinierung von Fen, wodurch deren proteosomaler Abbau initiiert wird und die Induktion von PCD ausbleibt. Deletiert man die C-terminale Domäne, wird die trunkierte Version von AvrPtoB erkannt und es kommt zur ETI (Abramovitch et al., 2003; Abramovitch et al., 2006; Janjusevic et al., 2006; Rosebrook et al., 2007). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass AvrPtoB Bax-induzierten Zelltod, durch R-Proteine vermittelten Zelltod und Zelltod in *S. cerevisiae* supprimieren kann (Abramovitch et al., 2003; Jamir et al., 2004; de Torres et al., 2006).

Für *U. maydis* wurden insgesamt 554 potentiell sekretierte Proteine identifiziert (Mueller et al., 2008), wovon 168 Proteinen eine enzymatische Funktion zugeordnet werden konnte. Für die verbleibenden 386 Proteine konnte hingegen keine eindeutige Vorhersage getroffen werden (Kämper et al., 2006; Mueller et al., 2008). Interessanterweise sind viele

der für sekretierte Proteine codierenden Gene in sogenannten Genclustern organisiert, welche aus mindestens drei Genen bestehen. Von den 12 identifizierten Clustern konnte nach Einzeldelation in fünf Fällen eine starke Veränderung der Virulenz verzeichnet werden, die von Hypervirulenz bis hin zum kompletten Pathogenitätsverlust reichte (Kämper et al., 2006). Zudem konnten anhand von Transkriptomdaten infizierter Maispflanzen Effektoren identifiziert werden, die in Abhängigkeit des infizierten Pflanzenorgans exprimiert werden und somit Organ-spezifische Funktionen haben (Skibbe et al., 2010). Allerdings konnte bislang nur für wenige Effektoren eine genaue Funktion beschrieben werden. Hierzu gehört die sekretierte Chorismatmutase Cmu1. Diese wird nach der Sekretion in den Apoplasten in die Pflanzenzelle transloziert, greift dort in den Shikimisäureweg ein und katalysiert die Umwandlung von Chorismat zu Prephenat. Dadurch steht weniger Chorismat zur Synthese von SA zur Verfügung, was zur Limitierung SA-abhängiger Abwehrreaktionen führt (Djamei et al., 2011). Gleichzeitig wird Cmu1 über Plasmodesmata in die umliegenden Zellen transferiert, wodurch es zu einem ‚*metabolic priming*‘ Effekt kommt (Djamei et al., 2011). Des Weiteren wurde anhand von Transkriptomdaten das 4 Gene umfassende pit-Cluster (*proteins important for tumours*) identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass Pit2 zusammen mit dem Transmembranprotein Pit1 eine wichtige Rolle bei der Tumorbildung spielt (Doehlemann et al., 2011). Während die genaue Funktion von Pit1 bislang noch unklar ist, konnte Pit2 als Protease-Inhibitor identifiziert werden (Mueller et al., 2013). Der Effektor inhibiert nach seiner Sekretion eine Reihe von apoplastischen Cysteinproteasen die Teil der SA-abhängigen Immunabwehr sind. Hierbei geht die Inhibition auf ein spezifisches Sequenzmotif zurück, welches in Pit2-Orthologen verwandter Brandpilze konserviert ist. Aufgrund seiner Funktion konnte Pit2 somit als essentieller Virulenzfaktor von *U. maydis* identifiziert werden (Mueller et al., 2013).

Ähnlich wie für *U. maydis* wurden für *U. hordei* anhand der Genomsequenz 515 potentiell sekretierte Proteine identifiziert, von denen 182 eine mögliche enzymatische Funktion haben, während für 333 keine Funktion postuliert werden konnte (Laurie et al., 2012). Vergleicht man diese 333 Gene mit den Genomen von *U. maydis* und *S. reilianum*, sind lediglich 47 Gene (14%) *U. hordei*-spezifisch. Hierunter konnten jedoch bereits sechs Avirulenzfaktoren (UhAvr1 - UhAvr6) identifiziert werden, die nach dem Prinzip der Gen-für-Gen-Hypothese mit den zugehörigen Resistenzproteinen aus Gerste (Ruh1 - Ruh6) interagieren und so eine Resistenz gegenüber dem jeweiligen *U. hordei*-Stamm vermitteln (Sidhu und Person, 1971; Sidhu und Person, 1972; Ebba und Person, 1975; Hu et al., 2003; Linning et al., 2004; Grewal et al., 2008).

1.5.1 Pep1, ein konservierter Virulenzfaktor

Ein sowohl für *U. maydis*, als auch für *U. hordei* beschriebener Effektor, ist der essentielle Virulenzfaktor Pep1 (*protein essential during penetration 1*). Da Pep1 essentiell für die Penetration der Pflanzenoberfläche sowie Zell-Zell-Übergängen ist, beschränkt sich das Expressionsprofil auf die pathogene Entwicklungsphase und wird der Appressorienbildung folgend induziert. Deletion von *pep1* führt zu einem apathogenen Phänotyp, da der Pilz nicht mehr in der Lage ist die initiale Penetration zu vollziehen. Gleichzeitig kommt es zur Erkennung durch die Pflanze, was in einer Induktion von Abwehrgenen resultiert. An der potentiellen Penetrationsstelle kommt es zur Akkumulation von ROS und zur Papillenbildung, sowie zu einer lokalen Zelltodantwort (Doehlemann et al., 2009). Für das *U. maydis*/Mais-Pathosystem konnte gezeigt werden, dass das im Apoplasten lokalisierende Protein direkt mit der sekretierten Mais-Peroxidase-12 (POX12) interagiert, welche nach Infektion mit dem $\Delta pep1$ -Stamm transkriptionell induziert wird (Hemetsberger et al., 2012). Gleichzeitig zeigen *in vitro* Experimente, dass heterolog exprimiertes Pep1 sowohl den durch Elizitoren hervorgerufenen ‚oxidative burst‘ in Mais, als auch die Aktivität einer Meerrettich-Peroxidase inhibiert. Gen-*silencing* von *pox12* führt zudem zu verminderten Abwehrreaktionen der Pflanze, der erfolgreichen Penetration von Epidermiszellen durch die *pep1*-Deletionsmutante und zur partiellen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps (Hemetsberger et al., 2012). Obwohl die genaue molekulare Funktion von Pep1 nur in der *U. maydis*/Mais-Interaktion beschrieben wurde, scheint das *U. hordei*-Ortholog dieselbe Aufgabe bei der Etablierung der biotrophen Interaktion zu haben, da es den $\Delta pep1$ -Phänotyp in *U. maydis* komplementieren kann (Doehlemann et al., 2009), was umgekehrt ebenfalls der Fall ist (D. Schwammbach, pers. Mitteilung; Hemetsberger, 2012). Die für Pep1 kodierenden Gene in *U. maydis* und *U. hordei* zeigen eine Identität von 61% und die korrespondierenden Proteine scheinen sowohl strukturell, als auch funktionell konserviert (Doehlemann et al., 2009; Hemetsberger et al., 2012). Pep1 konnte somit als konservierter Peroxidase-Inhibitor beschrieben werden, der durch direkte Interaktion mit einer Wirts-Peroxidase deren Abwehr-induzierte Aktivität unterbindet. Die dadurch vermittelte Suppression basaler Abwehrreaktionen im Zusammenhang mit der Bildung von ROS ermöglicht die Etablierung einer biotrophen Interaktion mit der Wirtspflanze (Doehlemann et al., 2009; Hemetsberger et al., 2012), wodurch Pep1 als ‚core effector‘ definiert wird (Doehlemann und Hemetsberger, 2013).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

U. hordei etabliert eine kompatible Interaktion mit seiner Wirtspflanze Gerste, in der keine bedeutenden pflanzlichen Abwehrreaktionen beobachtet werden können. Dementsprech-

end ist das Pathogen in der Lage das pflanzliche Immunsystem, insbesondere programmierten Zelltod, erfolgreich zu umgehen bzw. zu unterdrücken. Da neben Pep1 jedoch noch keine Effektoren für *U. hordei* beschrieben werden konnten, sollten im ersten Teil dieser Arbeit Proteine mit Virulenz-relevanter Funktion identifiziert werden. Basierend auf *U. hordei*-Transkriptomdaten (Mathow, 2011; D. Mathow und G. Doehlemann, pers. Mitteilung) wurden hierfür potentielle Kandidatengene ausgewählt, deren Deletionsmutanten auf Defekte während der Infektion von Gerstenpflanzen untersucht werden sollten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die molekularen und zellulären Vorgänge während einer Gersteninfektion genauer beschrieben werden. Hierfür sollten neben der kompatiblen Interaktion mit *U. hordei*, sowohl die inkompatible Nicht-Wirt-Interaktion mit *U. maydis*, als auch die inkompatible Interaktion mit der jeweiligen *pep1*-Deletionsmutante von *U. hordei* und *U. maydis* genauer charakterisiert werden. Da die inkompatiblen Interaktionen jeweils in programmiertem Zelltod resultieren, sollte hier insbesondere dessen Ausprägung beschrieben und der involvierte Mechanismus untersucht werden.

2 Ergebnisse

Die Voraussetzung zur erfolgreichen Etablierung einer biotrophen Interaktion ist die Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen und die Gewährleistung der Nährstoffversorgung durch das besiedelte Gewebe. Insbesondere die Unterdrückung von programmiertem Zelltod ist hierbei essentiell, da nur vitale Wirtszellen das Überleben des Pathogens sicherstellen.

Ustilago hordei zeigt eine solche Anpassung. Die Infektion seiner Wirtspflanze Gerste verläuft nahezu ohne sichtbare Symptome, da sämtliche Immunantworten erfolgreich unterdrückt werden können. Somit zeigt sich *U. hordei* als vollständig adaptiertes biotrophes Pathogen. Die spezifischen molekularen Grundlagen hierfür sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

2.1 Charakterisierung der frühen Infektionsphase von *U. hordei*

In Anlehnung an das etablierte *U. maydis*/Mais-Pathosystem bei dem sieben Tage alte Maissetzlinge im 3-Blatt-Stadium infiziert werden, wurde eine analoge Strategie zur Infektion von Gerstenpflanzen mit *U. hordei* angewandt. Bei dieser Methode wird die Sporidiensuspension mit Hilfe einer Nadel in das Innere des Blattwirtels zehn Tage alter Gerstenpflanzen gespritzt. Demnach wird nicht, wie bei einer Freilandinfektion, die Koleoptile bei der Pilzinfektion adressiert, sondern das junge dritte Blatt der Pflanze. Aufgrund dessen wurde der Infektionsprozess für diese Infektionsart neu analysiert.

Zur detaillierten Charakterisierung der frühen Infektionsphase wurden zehn Tage alte Gerstenpflanzen des Kultivars ‚Golden Promise‘ mit einer *U. hordei*-Sporidiensuspension infiziert. Diese bestand zu gleichen Teilen aus Sporidien beider Kreuzungspartner (*MAT-1*: 4857-4, *MAT-2*: 4857-5) und wurde auf eine definierte Sporidiendichte ($OD_{600} = 3$, was etwa $1 - 2 \times 10^8$ Zellen entspricht) eingestellt. Zusätzlich wurde der Suspension 0,1% des Tensids Tween20 zugesetzt, um die Hydrophobizität der Blattoberfläche gegenüber der Suspension zu verringern und dadurch die Anlagerung der Sporidien an die Blattoberfläche zu verbessern. Diese Infektionsparameter dienen als Standardmethode für alle folgenden Pflanzeninfektionen.

Zunächst wurden die Auswirkungen einer *U. hordei*-Infektion auf makroskopischer Ebene untersucht. Sechs Tage nach der Infektion zeigen infizierte Blätter makroskopisch kaum auffällige Symptome. Lediglich vereinzelte chlorotische Läsionen sind im Vergleich zu Kontroll- (mock-)infizierten Pflanzen erkennbar (Abb. 8A). Dies ist auf Bereiche mit einer sehr hohen Sporidiendichte zurückzuführen, denn mikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass die Sporidien nicht gleichmäßig auf der Blattoberfläche verteilt sind, sondern

oftmals in Aggregaten vorliegen aus denen keine infektiösen Strukturen hervorgehen (nicht gezeigt). Diese werden möglicherweise von der Pflanze erkannt und führen zu lokalen Abwehrreaktionen die in Chlorosen resultieren.

In einer vorangegangenen Studie konnte die Penetration bereits für ein Zeitfenster von 18 bis mindestens 22 Stunden nach der Infektion beschrieben werden, da die einzelnen Infektionsereignisse nicht synchronisiert ablaufen (Hof, 2009). Demzufolge wurde die Quantifizierung der Appressorienbildung ca. 20 hpi durchgeführt. Hierfür wurden die infizierten Blattareale mit Calcofluor gefärbt, um Pilzstrukturen auf der Blattoberfläche sichtbar zu machen, da Calcofluor spezifisch an Chitin-haltige Strukturen bindet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass ca. 35% aller dikaryotischen Filamente zu diesem Zeitpunkt ein Appressorium ausgebildet hatten (Abb. 8 B). Um die Effizienz der folgenden Penetrationsereignisse bestimmen zu können, wurden infizierte Blätter 30 hpi neben Calcofluor auch mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und FM4-64 angefärbt. Während FM4-64 spezifisch pflanzliche Membranen anfärbt, wird das membrangängige FDA im Cytoplasma durch Esterase-Aktivität gespalten und fluoresziert grün, wodurch das invaginierte Cytoplasma sichtbar gemacht werden kann. Die gleichzeitige Färbung von FM4-64 und FDA erfolgte durch Vakuuminfiltration der infizierten Blattbereiche, welche nach anschließender Calcofluor-Färbung mittels konfokaler Mikroskopie untersucht wurden. Dadurch konnte

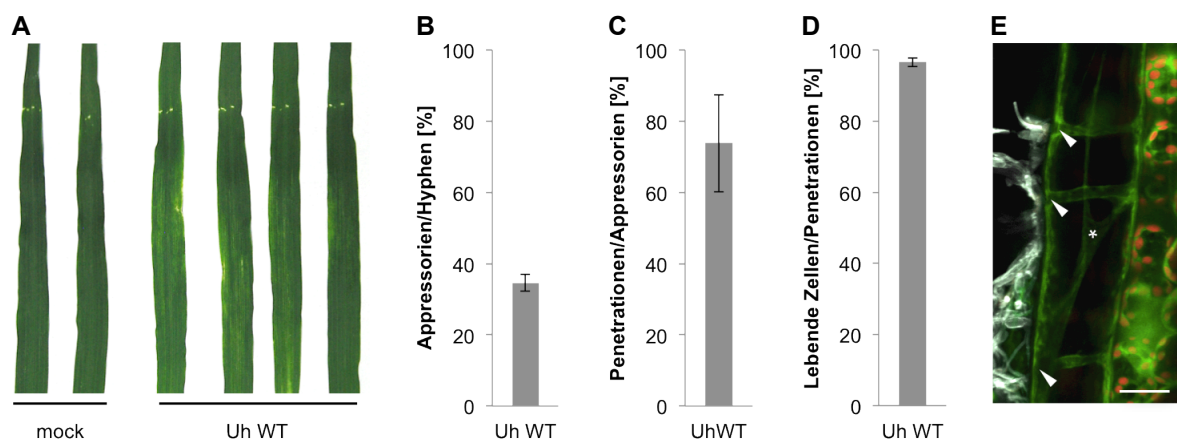


Abb. 8: Die frühe Infektionsphase von *U. hordei*. Grundlegende Merkmale einer kompatiblen Interaktion im *U. hordei*/Gerste-Pathosystem. **A**, Makroskopische Symptome von Gerstenblättern nach mock- (links) und *U. hordei*-Infektion (Uh WT; rechts), 6 dpi. Im direkten Vergleich wird deutlich, dass die Pilzinfektion in leichten Chlorosen resultiert, jedoch keine bedeutenden Symptome hervorbringt; **B**, Quantifizierung der Appressorienbildung auf der Blattoberfläche. 20 hpi bilden 34,6% der dikaryotischen Filamente auf der Blattoberfläche ein Appressorium aus (n=697); **C**, Quantifizierung der Penetrationseffizienz. 30 hpi ging aus 73,8% der ausgebildeten Appressorien eine erfolgreiche Oberflächenpenetration hervor (n=149); **D**, Quantifizierung der Zellviabilität. 48 hpi sind 96,5% der penetrierten Zellen vital und zeigen keinerlei morphologische Veränderungen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (n=169). Die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei biologischen Replikaten (B-D); **E**, Konfokalmikroskopische Aufnahme einer mehrfach penetrierten Epidermiszelle 30 hpi, bei der die Cytoplasmamembran durch die invasive Hyphe invaginiert wurde und diese folglich umschließt (FDA/FM4-64/Calcofluor-Färbung). Pilzhyphen auf der Oberfläche sind in weiß, das Pflanzencytoplasma in grün dargestellt; Pfeilspitzen zeigen die Penetrationsstellen, der Stern markiert cytoplasmatische Fäden. Maßstab: 20 μ m

gezeigt werden, dass ca. 74% aller ausgebildeten Appressorien in einer erfolgreichen Oberflächenpenetration resultieren (Abb. 8 C und E). Dieselben Färbemethoden wurden ebenfalls angewandt um die Zellviabilität der penetrierten Epidermiszellen zu untersuchen, denn FDA ermöglicht auch zwischen toten und vitalen Zellen zu differenzieren, da es ausschließlich in lebenden Zellen prozessiert werden kann. Dementsprechend wurden infizierte Blätter 48 hpi gefärbt und ausgewertet, wobei fast 97% aller penetrierten Zellen als vital identifiziert werden konnten (Abb. 8 D und E). Zusammengefasst zeigen diese Daten die vollständige Anpassung von *U. hordei* an seine Wirtspflanze Gerste zur Etablierung einer kompatiblen biotrophen Interaktion.

Für eine weitergehende Untersuchung des Infektionsverlaufs wurden infizierte Blätter im Zeitraum von zwei bis sechs Tagen nach der Infektion geerntet und zur Visualisierung der Pilzhyphen im Blatt einer WGA-Alexafluor-488/Propidiumiodid-Färbung (WGA-AF488/PI) unterzogen. Das Lektin WGA (*wheat germ agglutinin*) bindet an das Chitin der Pilzzellwand und ist an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexafluor-488 gekoppelt, während Propidiumiodid die Pflanzenzellwand anfärbt. Dadurch sind Pilzhyphen in grün und Pflanzenzellen in rot dargestellt. Die angefärbten Blätter wurden anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (Abb. 9). Hierbei konnte gezeigt werden, dass *U. hordei* bereits zwei Tage nach der Infektion in das Mesophyllgewebe vorgedrungen ist

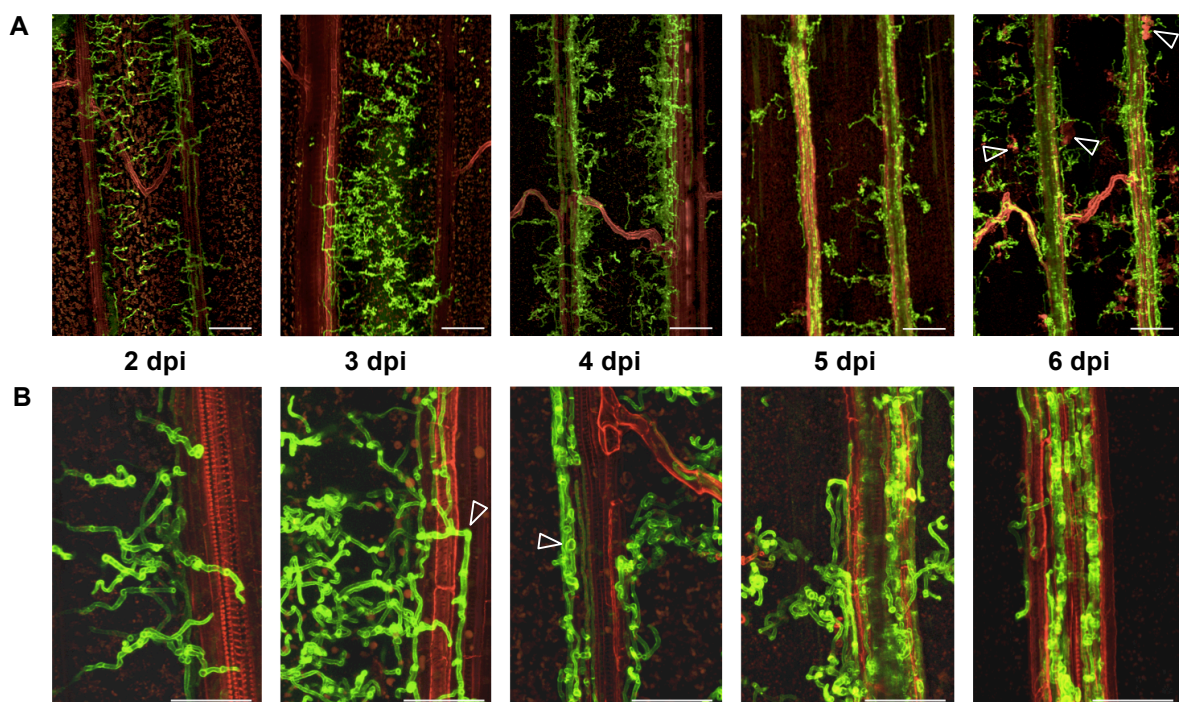
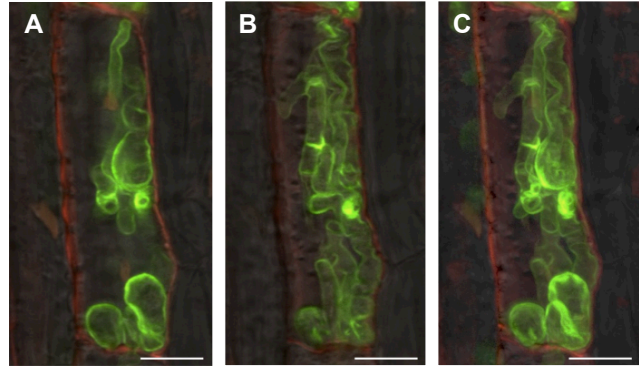


Abb. 9: Blattbesiedelung im *U. hordei*/Gerste-Pathosystem während der frühen Infektionsphase. Konfokal-mikroskopische Aufnahmen zeigen das Wachstumsverhalten von *U. hordei in planta* im Verlauf der ersten 6 Tage nach Blattinfektion. Die Pilzhyphen breiten sich im Gewebe aus, bis sie auf die Leitbündel des Blattes treffen. Folglich kommt es zu Streckenwachstum entlang des vaskulären Systems. Eine vermehrte Proliferation des Pilzes im Blatt bleibt aus. Details, siehe Text. **A**, Übersichtsaufnahmen, Maßstab: 100 μ m; **B**, Detailaufnahmen, Maßstab: 50 μ m; WGA-AF488/PI-Färbung; Pflanzenzellen sind in rot, Pilzhyphen in grün dargestellt.

Abb. 10: Morphologische Oberflächenvergrößerung der Pilzhypen. Konfokalmikroskopische Aufnahme einer besiedelten Bündelscheidenzelle, 5 dpi. Einige Pilzhypen zeigen eine signifikant vergrößerte Oberfläche, insbesondere im Bereich der Hyphenspitzen. **A**, Aufnahme der oberen Zellebene; **B**, Aufnahme der unteren Zellebene; **C**, Überlagerte Aufnahmen der gesamten Zelle. WGA-AF488/PI-Färbung; Pflanzenzellen sind in rot, Pilzhypen in grün dargestellt; Maßstab: 10 µm.



und sich dort ausbreitet. Nach drei Tagen haben die ersten Hyphen bereits die Leitbündel des Blattes erreicht und beginnen ein gerichtetes Streckenwachstum entlang des vaskulären Systems (Abb. 9 B, 3 dpi, Pfeilspitze). Neben einer ausgeprägten Besiedelung der Leitbündel kann man nach 4 Tagen erste Anzeichen einer Oberflächenvergrößerung der Pilzhypen erkennen (Abb. 9 B, 4 dpi, Pfeilspitze; Abb. 10). Nach fünf Tagen beschränkt sich das Hyphenwachstum fast ausschließlich auf die Leitbündel und die angrenzenden Bündelscheidenzellen, wobei deutlich wird, dass der Pilz sowohl entlang, als auch innerhalb der Leitbündel wächst. Sechs Tage nach der Infektion sind die Oberflächen fast aller Leitbündel-assoziiierter Hyphen vergrößert. Zu diesem Zeitpunkt scheinen im Mesophyll wachsende Hyphen vereinzelt Immunreaktionen auszulösen, da manche Zellen eine starke Autofluoreszenz zeigen (Abb. 9 A, 6 dpi, Pfeilspitzen). Besonders auffällig waren die Vergrößerungen der Hyphenoberflächen, welche ab 4 dpi zu beobachten waren und fortlaufend größer wurden. Diese an Haustorien erinnernden Strukturen wurden für *U. hordei* bislang noch nicht beschrieben. Interessanterweise konnte diese morphologische Veränderung nur bei Hyphen beobachtet werden, die innerhalb eines Leitbündels oder den angrenzenden Bündelscheidenzellen wachsen (Abb. 10). Bei Hyphen im Mesophyllgewebe war dies nicht der Fall.

2.1.1 *U. hordei* unterdrückt aktiv PAMP-induzierten Zelltod

Dass nach einer Infektion mit *U. hordei* keine prominenten Pflanzenreaktionen beobachtet werden können, wurde bereits mehrfach bestätigt. Allerdings stellt sich hierbei die Frage, ob der Pilz zur Etablierung der biotrophen Interaktion Abwehrreaktionen der Pflanze aktiv unterdrücken kann, oder sich maskiert um nicht vom pflanzlichen Immunsystem erkannt zu werden. Um zu überprüfen ob hier ein aktiver oder ein passiver Prozess vorliegt wurden zehn Tage alte Gerstenpflanzen mit *U. hordei* oder einer mock-Kontroll-suspension infiziert. Zwei Tage nach der Infektion, wenn sich der Pilz bereits erfolgreich im Gewebe etabliert hat, wurden die jeweils infizierten Blattbereiche (ca. 2 - 3 cm unterhalb der Einstichstelle) mit Chitosan (7 mg/ml) oder einer Wasserkontrolle infiltriert.

Bei Chitosan handelt es sich um deacetyliertes Chitin welches als PAMP von Pflanzen erkannt werden kann. Vier Tage nach der Infiltration wurden die Blätter makroskopisch untersucht und ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Infiltration mit Wasser keinerlei Auswirkungen auf das infizierte Gewebe hat, weder bei mock-, noch bei *U. hordei*-infizierten Blättern. Lediglich die durch den Infiltrationsvorgang mechanisch beschädigten Blattbereiche zeigten nekrotische Läsionen. Wurden mock-infizierte Blätter mit Chitosan infiltriert, so zeigte sich der infiltrierte Bereich bereits nach zwei Tagen chlorotisch. Nach weiteren zwei Tagen war meist der gesamte infiltrierte Bereich trocken, spröde und ausgebleicht, was auf abgestorbenes Blattgewebe hindeutet. Somit löst die Chitosan-Behandlung massive Abwehrreaktionen der Pflanze aus, die in Zelltod resultieren (Abb. 11). Wurden hingegen Pflanzen mit Chitosan infiltriert, die zuvor mit *U. hordei* infiziert wurden, so zeigte sich, dass der infiltrierte Bereich zwar teilweise chlorotisch wurde, ein Absterben des Bereichs jedoch ausblieb (Abb. 11). *U. hordei* ist somit in der Lage die durch Chitosan hervorgerufene Zelltodreaktion zu unterdrücken. Dies weist darauf hin, dass der Pilz mit dem pflanzlichen Immunsystem interferiert, um die PAMP-vermittelte Pflanzenabwehr zu supprimieren.

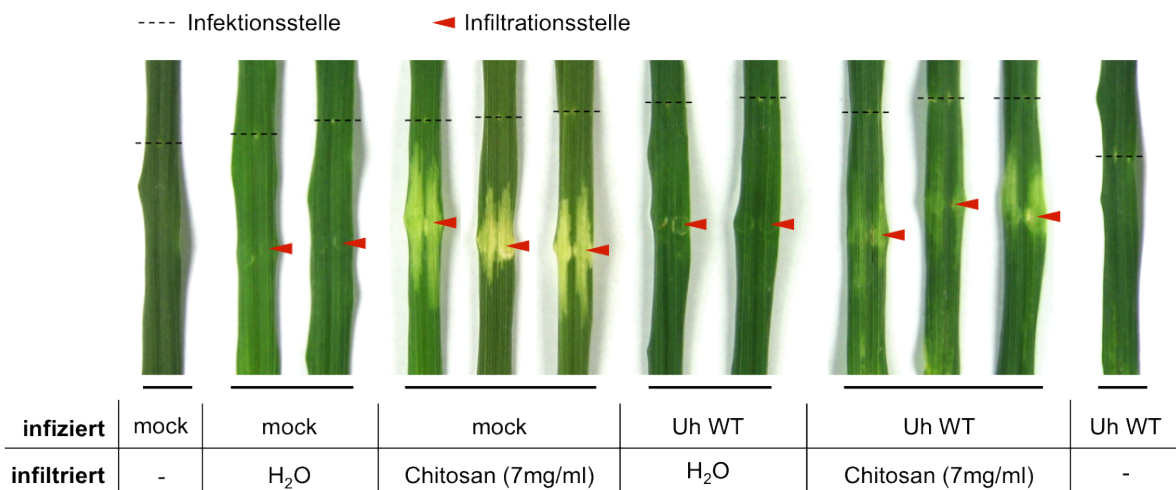


Abb. 11: Aktive Suppression von Chitosan-induzierten Abwehrreaktionen. Mock- oder mit *U. hordei* (Uh WT)-infizierte Gerstenpflanzen, die zwei Tage nach der Infektion im infizierten Bereich (ca. 2-4 cm unterhalb der Einstichstelle) mit Chitosan oder Wasser infiltriert wurden. Die Infiltration von Chitosan verursacht in mock-infizierten Pflanzen massive Abwehrreaktionen die in programmiertem Zelltod resultieren. In *U. hordei* infizierten Pflanzen ist der Pilz jedoch in der Lage diese Abwehrmechanismen weitgehend zu unterdrücken und die infiltrierte Bereiche bleiben vital. Die Kontrollinfektion und -infiltration zeigen keine Auswirkungen.

2.2 Identifizierung von *U. hordei*-Effektoren mit Virulenz-relevanter Funktion

Pep1 konnte als essentieller Virulenzfaktor von *U. hordei* identifiziert und verifiziert werden, der PAMP-vermittelte Abwehr direkt unterdrückt (Doehlemann et al., 2009; Hemetsberger et al., 2012). Die Etablierung einer kompatiblen Interaktion mit Gerste bedingt jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit die Aktivität weiterer sekretierter Virulenzfaktoren. Daher wurden anhand von *Microarray*-basierten Transkriptomanalysen der frühen Infektionsphase von *U. hordei* Kandidatengene aufgrund ihrer transkriptionellen Induktion ausgewählt um diese auf eine mögliche Virulenz-Funktion hin zu untersuchen. Dafür sollten zunächst Deletionsmutanten der Kandidatengene generiert werden, welche folglich in Pflanzeninfektionsexperimenten auf potentielle Defekte während der Besiedelung getestet werden sollten.

2.2.1 Transkriptomdaten als Basis für die Auswahl von Kandidatengen

Im Rahmen seiner Masterarbeit wurden von Daniel Mathow *Microarray*-basierte Transkriptomanalysen der frühen Infektionsphase von *U. hordei* während der Blattinfektion durchgeführt. Hierfür wurden basierend auf den mikroskopischen Untersuchungen des frühen Infektionsprozesses (Kapitel 2.1) zwei frühe Zeitpunkte (20 hpi und 40 hpi), sowie zwei spätere Zeitpunkte (3 dpi und 6 dpi) gewählt, um die transkriptionelle Regulation von Genen sowohl während der initialen Penetration, als auch während dessen Wachstum entlang der Leitbündel zu untersuchen. Im Anschluss an seine Masterarbeit wurden von Daniel Mathow weitere *Microarray*-basierte Transkriptomanalysen von *U. hordei* in inkompatiblen Interaktionen durchgeführt. Hierfür wurden die transkriptionellen Veränderungen der *U. hordei pep1*-Deletionsmutante und der inkompatiblen Interaktion von *U. hordei* mit Mais jeweils 20 hpi untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass im Vergleich zur jeweiligen Flüssigkultur in allen analysierten Interaktionen eine Vielzahl an Genen differenziell reguliert wird. Dabei umfassen die für Effektorkandidaten codierenden

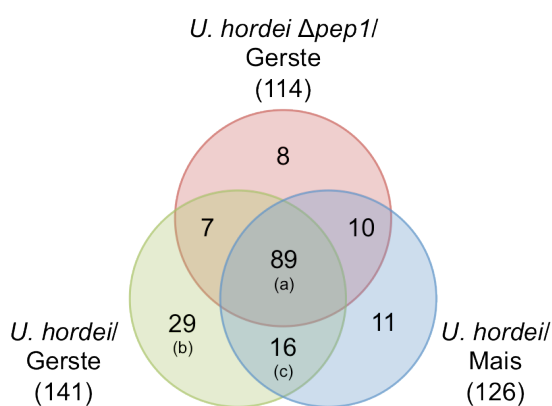


Abb. 12: VENN-Diagramm der induzierten Effektoren während der analysierten kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen 20 hpi. Angegeben ist die Anzahl der Gene welche für sekretierte Effektoren kodieren und während der Interaktionen von *U. hordei* mit Gerste, *U. hordei $\Delta pep1$* mit Gerste und *U. hordei* mit Mais mehr als 2-fach induziert sind. Anhand der Kreisüberschneidungen erkennt man Gene, die in einer, zwei oder allen drei Interaktionen induziert werden. (a), (b) und (c) indizieren die Zugehörigkeit der ausgewählten Kandidatengene für weitere Untersuchungen (siehe Tabelle 1).

Gene jeweils ca. ¼ aller regulierten Transkripte. Im direkten Vergleich zeigt sich, dass 89 Effektorkandidaten in allen drei Interaktionen induziert sind, während eine deutlich geringere Anzahl spezifisch in einer oder zwei der Interaktionen induziert werden (vergl. Abb. 12) (D. Mathow und G. Döhlemann, pers. Mitteilung).

Basierend auf diesen Datensätzen wurden 18 Kandidatengene für weitere Untersuchungen ausgewählt, welche in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Kriterien zur Auswahl waren hierbei (i) die starke Induktion während der frühen Zeitpunkte, (ii) die starke Induktion während der späteren Zeitpunkte, sowie (iii) ein stark von der Genexpression während der kompatiblen Interaktion abweichendes Expressionslevel während der inkompatiblen Interaktionen (vergl. Tabelle 1). Hierunter finden sich 11 Gene die in allen drei analysierten Interaktionen induziert sind, drei Gene die ausschließlich in der kompatiblen Interaktion von *U. hordei* mit Gerste induziert werden und vier Gene die spezifisch in den Interaktionen von *U. hordei* mit Gerste und *U. hordei* mit Mais induziert sind. Gleichzeitig zählen neun der Kandidaten zu den 25 genomweit am stärksten induzierten Transkripten.

Tabelle 1: Übersicht der ausgewählten Kandidatengene mit den zugehörigen Expressionsdaten der analysierten Zeitpunkte. Die Kandidaten wurden anhand der Gennummer aufsteigend sortiert. Entsprechende Auswahlkriterien, potentielle Funktionen, korrespondierende *U. maydis* Orthologe und die Zugehörigkeit der Kandidatengene zu den korrespondierenden Interaktionsgruppen sind angegeben (vergl. Abb. 12).

<i>U. hordei</i> Gen	Differenzielle Regulation (X-fach) im Vergleich zur Genexpression in Flüssigkultur						Annotation	<i>U. maydis</i> Ortholog
	Uh WT 20 hpi Gerste	Uh WT 40 hpi Gerste	Uh WT 3 dpi Gerste	Uh WT 6 dpi Gerste	Uh $\Delta pep1$ 20 hpi Gerste	Uh WT 20 hpi Mais		
<i>UH_00127</i> ♦ (c)	48,2	3,2	1,4	1,1	0,0	40,7	-	-
<i>UH_02413</i> ♦ (a)	269,5	43,0	2,6	11,5	390,9	386,6	-	<i>um11886</i>
<i>UH_02700</i> ♦♦♦ (a) (*)	466,2	625,6	1802,9	1752,0	36,6	263,9	-	<i>um01820</i>
<i>UH_02811</i> ♦ (a)	24,1	4,0	1,1	1,9	12,8	8,5	-	<i>um01894</i>
<i>UH_03203</i> ♦♦ (a)	44,6	15,5	4,8	13,5	11,9	80,1	-	<i>um05222</i>
<i>UH_03322</i> ♦ (a) (*)	7,4	128,4	274,1	196,4	3,5	2,7	-	-
<i>UH_03756</i> ♦ (c)	20,1	1,5	-2,2	-2,9	0,0	15,1	Stress response Protein	<i>um11403</i>
<i>UH_04865</i> ♦ (a) (*)	14,8	374,4	742,1	644,9	7,3	3,2	-	<i>um03105</i>
<i>UH_04984</i> ♦♦ (b)	2,3	79,6	168,6	130,7	0,0	1,0	-	<i>um03201</i>
<i>UH_05101</i> ♦ (a) (*)	11,8	39,3	146,3	102,6	8,4	7,0	-	<i>um03274</i>
<i>UH_05270</i> ♦ (b)	31,5	-2,6	-5,5	-4,1	0,0	1,5	Endo- β -Xylanase	<i>um03411</i>

UH_05948 ◆ (a)	138,9	18,9	-1,5	-1,1	125,5	105,4	Pseudouridin Synthase c	um03924
UH_07510 ◆◆◆ (c) (*)	4,8	375,5	266,6	160,5	0,0	4,4	Metallo- protease	um03630
UH_08049 ◆ (a) (*)	1649,3	260,0	36,4	62,5	400,1	1452,3	-	-
UH_08819 ◆◆ (b)	3,8	97,0	201,6	154,3	0,0	1,8	-	-
UH_13384 ◆◆◆ (c) (*)	5,1	241,7	319,3	200,9	0,0	4,7	-	-
UH_14478 ◆◆ (a) (*)	19,8	199,7	195,1	239,7	11,8	7,8	-	-
UH_16458 ◆◆ (a) (*)	12,8	527,7	1064,1	955,6	8,5	4,4	-	-

- (a) Gene die in allen drei analysierten Interaktionen 20 hpi induziert sind
 (b) Gene die ausschließlich in der kompatiblen Interaktion von *U. hordei* mit Gerste induziert sind
 (c) Gene die spezifisch in der *U. hordei*/Gerste- und der *U. hordei*/Mais-Interaktion induziert sind
 (*) Gene die zu den 25 genomweit am stärksten induzierten Transkripten gehören
 ◆ Auswahl aufgrund starker Induktion während der frühen Zeitpunkte (20 hpi, 40 hpi)
 ◆◆ Auswahl aufgrund starker Induktion während der späteren Zeitpunkte (3 dpi, 6 dpi)
 ◆◆◆ Auswahl aufgrund des abweichenden Expressionslevels während der einer oder beider inkompatibler Interaktionen im Vergleich zum kompatiblen Interaktion abweicht.

Zusätzlich wurde das *U. hordei*-Ortholog (UH_02064) des *U. maydis*-Effektors Pit2 ausgewählt, welcher bereits als Virulenzfaktor für *U. maydis* beschrieben werden konnte (Doehlemann et al., 2011; Mueller et al., 2013).

2.2.2 Deletion, Verifizierung und Untersuchung der Kandidatengene

Um eine potentielle Virulenz-relevante Funktion der ausgewählten Kandidatengene untersuchen zu können, wurden *U. hordei*-Stämme mit entsprechenden Gendelektionen der jeweiligen Kandidaten generiert. Hierfür wurde das jeweilige Kandidatengen mittels homologer Rekombination durch einen Hygromycin-Selektionsmarker ersetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels dieser Technik 18 der 19 Kandidaten deletiert. Lediglich für UH_08819 konnte bislang kein Deletionskonstrukt kloniert werden, sodass in diesem Fall noch keine Deletion möglich war. Zur Verifizierung der Deletionsmutanten wurde eine Kombination aus mehreren PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierbei wurde die DNA der Mutanten jeweils auf die Abwesenheit des Kandidatengens, die Größe des Rekombinations-Locus, sowie die Anwesenheit und korrekte Integration des Selektionsmarkers überprüft (vergl. Abb. 30). Korrekte Deletionsmutanten beider Ausgangsstämme wurden anschließend in einer Kreuzungsanalyse auf *in vitro*-Filamentbildung untersucht. Hierbei werden die Kreuzungspartner auf Aktivkohle-haltige Agarplatten aufgetropft, wodurch die Filamentbildung auf Festmedium induziert wird und die Kolonien weiß erscheinen. Anschließend wurden, wenn möglich jeweils, drei Kreuzungs-Kombinationen für die folgenden Pflanzeninfektionen ausgewählt.

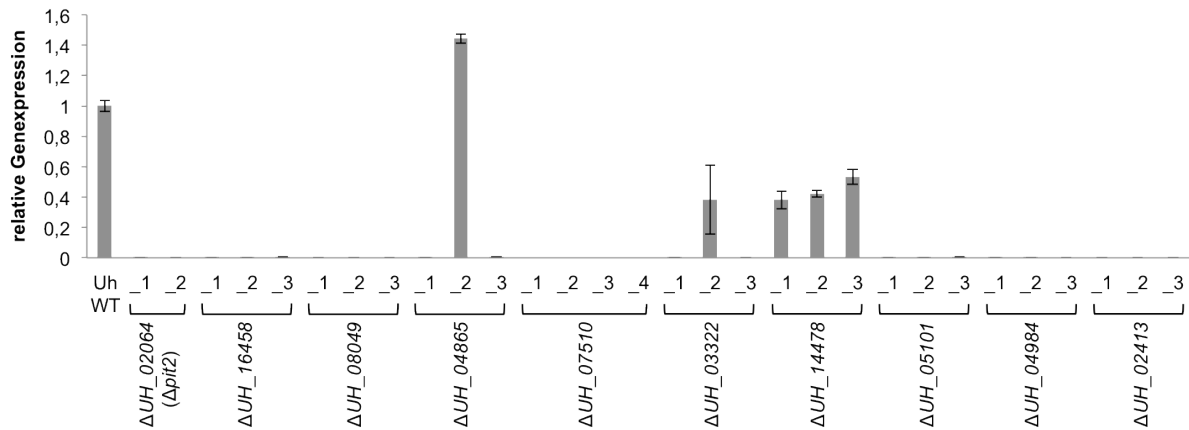


Abb. 13: Genexpression der getesteten Deletionsmutanten während der Infektion von Gerste. Die verschiedenen Deletionsmutanten wurden während der Pflanzeninfektion auf die Expression des jeweiligen Kandidatengens überprüft. Das Balkendiagramm zeigt die relative Genexpression der infizierten Kreuzungsstämmen in direkter Relation zur Genexpression der Wildtyp-Stämme von *U. hordei* (Uh WT) 6 dpi. Für ΔUH_{04865} und ΔUH_{03322} konnte jeweils eine der drei getesteten Kreuzungen nicht als ‚knock out‘ bestätigt werden. Für ΔUH_{14478} konnte eine Expression des Kandidatengens in allen drei Fällen nachgewiesen werden. Die restlichen Kreuzungen zeigen die eindeutige Deletion des Kandidatengens. Die Genexpression während der Wildtyp-Infektion wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM aus zwei technischen Replikaten.

Insgesamt zehn der generierten Deletionsstämmen konnten bislang auf einen möglichen Defekt während der Blattbesiedelung innerhalb der frühen Infektionsphase getestet werden. Neben der Quantifizierung der Pilzbiomasse im Blattgewebe wurde hierbei gleichzeitig die Expression des deletierten Kandidatengens überprüft, um die jeweilige Deletion auch *in vivo* bestätigen zu können. Hierfür wurden jeweils 15 infizierte Blätter 6 dpi geerntet und mit 1% Tween20 abgewaschen, um Sporidien und Pilzhyphen von deren Oberfläche zu entfernen. Anschließend wurde das Blattmaterial zur Präparation von RNA und DNA verwendet.

Mittels quantitativer *real-time* PCR wurde die Genexpression bei Infektion mit der Deletionsmutante jeweils mit der Genexpression während der Wildtyp-Infektion verglichen. Als Referenz für die Transkriptmenge wurde *ppi* verwendet, ein Gen welches konstitutiv exprimiert wird und für eine Peptidylpropyl-Isomerase codiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich unter allen 30 getesteten Stämmen 25 eindeutige Deletionsmutanten befanden, wohingegen 5 Stämme, trotz deren vorheriger PCR-basierter Verifizierung, eine Expression des jeweiligen Kandidatengens zeigten (Abb. 13).

Eine Quantifizierung der Pilzbesiedelung im infizierten Gewebe erfolgte durch quantitative PCR, bei der auf DNA-Basis die Menge des vorhandenen *ppi*-Gens in Relation zur Menge des Pflanzen-spezifischen *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase)-Gens verglichen wird. Dadurch kann das Mengenverhältnis von Pilzzellen gegenüber Pflanzenzellen bestimmt werden, was im Vergleich zur Wildtyp-Infektion Rückschlüsse auf die quantitative Pilzbesiedelung erlaubt und somit mögliche Wachstums- oder Infektionsdefekte aufzeigt. Als Kontrolle wurden hierfür Infektionen mit der *pep1*-Deletionsmutante

verwendet, da die apathogene Mutante das Blattgewebe nicht besiedeln kann. Die Ergebnisse zur Blattbesiedelung der getesteten Deletionsstämme zeigen ein sehr gemischtes Bild. So konnte bisher für ΔUH_02064 ($\Delta pit2$), ΔUH_16458 , ΔUH_08049 , ΔUH_04865 und ΔUH_05101 eine Reduktion der Pilzbesiedelung im Vergleich zur Wildtyp-Infektion gezeigt werden. ΔUH_07510 zeigt hingegen eine Wildtyp-ähnliche Besiedelung und die Menge an Pilz-DNA nach Infektion mit ΔUH_03322 ist leicht erhöht (Abb. 15). Allerdings handelt es sich hierbei nur um vorläufige Ergebnisse, da die Datensätze nur auf einem oder zwei biologischen Replikaten beruhen (vergl. Abb. 14). Lediglich für die Deletion der potentiellen Metalloprotease (UH_07510) wurde die Pilzbiomasse in drei biologischen Replikaten bestimmt, es zeigte sich jedoch kein veränderter Phänotyp. Die Daten für ΔUH_04984 und ΔUH_02413 lassen derzeit noch keine Rückschlüsse über eine mögliche Änderung der Pilzbiomasse im Vergleich zum Wildtyp zu, da in beiden Fällen die drei getesteten Kreuzungen sehr unterschiedliche Effekte zeigen und sich dadurch keine Tendenz abzeichnet (Abb. 14). Zusätzliche Replikate sind demnach für alle Infektionen nötig um stabile Datensätze zu produzieren.

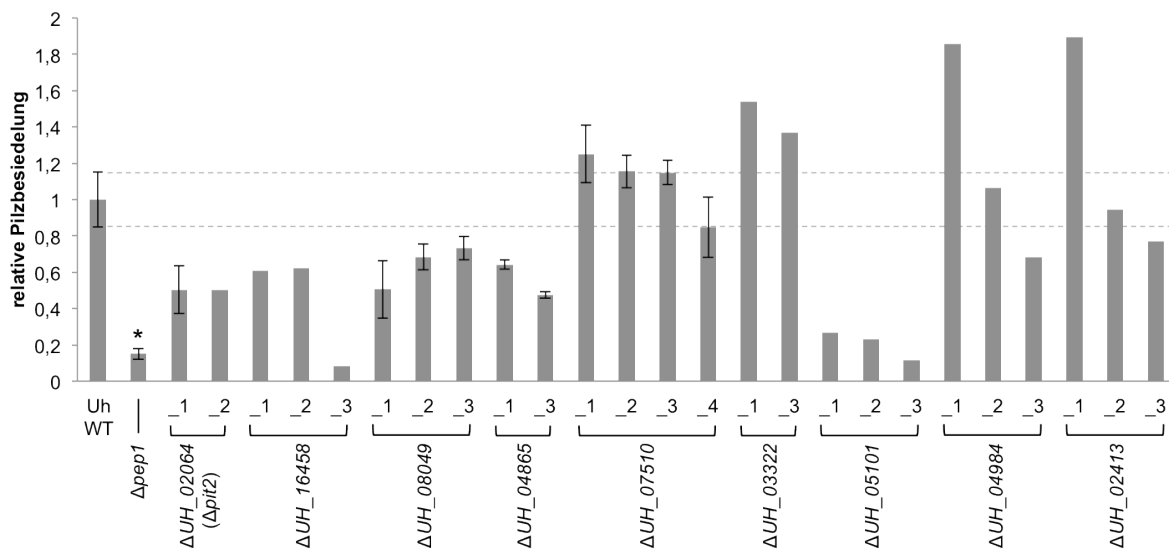


Abb. 14: Quantifizierung der Pilzbesiedelung in infiziertem Blattgewebe. Vorläufige Ergebnisse zur *in planta* Pilzentwicklung verschiedener Deletionsmutanten im Vergleich zur Wildtyp-Infektion (Uh WT) zeigen reduzierte, gesteigerte und unveränderte Pilzbesiedelungen 6 dpi. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien kennzeichnet den SEM der Wildtyp-Infektion, welche gleich 1 gesetzt wurde. Werte innerhalb dieser Abgrenzung werden als Wildtyp-ähnlich angesehen und zeigen demnach keinen Phänotyp. Fehlerindikatoren zeigen den SEM aus zwei, bzw. drei (für Uh WT, $\Delta pep1$, ΔUH_07510) biologischen Replikaten; Daten ohne Fehlerindikator beruhen auf einem biologischen Replikat; * $P \leq 0,05$ (ungepaarter *t*-Test).

2.3 Zelltod in inkompatiblen *Ustilago*/Gerste-Interaktionen

Microarray-basierte Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass während der inkompatiblen Interaktionen von Mais mit der *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante und *U. hordei* als Nicht-Wirt-Pathogen massive pflanzliche Abwehrreaktionen induziert werden die in programmiertem Zelltod resultieren (Doehlemann et al., 2009; van der Linde, 2011). Auch für Gerste konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit der *U. hordei* $\Delta pep1$ Mutante in lokalem PCD resultiert (Doehlemann et al., 2009). Eine epidermale Resistenz zeigt sich bei Gerste auch gegenüber dem Maispathogen *U. maydis*.

In dieser Arbeit wurden die inkompatible Interaktion mit der *U. hordei* $\Delta pep1$ -Mutante und die Nicht-Wirt-Resistenz gegenüber *U. maydis* vergleichend analysiert. Zusätzlich wurde die Interaktion mit der *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante untersucht, da diese dieselbe Effektordeletion wie *U. hordei* $\Delta pep1$ trägt, aber gleichzeitig ein Nicht-Wirt-Pathogen gegenüber Gerste ist.

2.3.1 Inkompatible Interaktionen führen zu programmiertem Zelltod

Zur Charakterisierung der verschiedenen Interaktionen wurden zehn Tage alte Gerstenpflanzen mit Sporidiensuspensionen der jeweils korrespondierenden Kreuzungspartner von *U. hordei* und der *U. hordei* $pep1$ -Deletionsmutante, sowie von *U. maydis* und der *U. maydis* $pep1$ -Deletionsmutante infiziert.

Zur Quantifizierung der Appressorienbildung wurden infizierte Blattbereiche 20 hpi mit Calcofluor gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Rate an ausgebildeten Appressorien auf der Gerstenblattoberfläche für alle getesteten Stämme vergleichbar ist und etwa der von *U. hordei* entspricht (Abb. 15 A). Die beiden *U. maydis*-Stämme zeigen folglich keinen Unterschied in der Appressorienbildung im Vergleich zu den beiden *U. hordei*-Stämmen. Die Penetrationseffizienz wurde 30 hpi mittels FDA/FM4-64/Calcofluor-Färbung bestimmt. Entgegen der Appressorienbildung zeigt sich hier eine signifikante Reduktion der Penetrationseffizienzen im Vergleich zur Infektion mit *U. hordei*. Während hier aus ca. 74% der ausgebildeten Appressorien eine erfolgreiche Penetration hervorgeht, erfolgt dies bei *U. hordei* $\Delta pep1$ nur in 14% der Fälle. Bei *U. maydis* und *U. maydis* $\Delta pep1$ resultieren nur 13% der Appressorien in einer Penetration der Epidermis (Abb. 15 B). Interessanterweise zeigen beide $\Delta pep1$ -Stämme multiple Penetrationsversuche ausgehend von einem Appressorium (Abb. 15 E und G), ein Phänomen welches bereits bei Maisinfektionen durch *U. maydis* $\Delta pep1$ beobachtet werden konnte (Doehlemann et al., 2009). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Penetrationshyphen von *U. maydis*, im Vergleich zu den Penetrationsversuchen durch

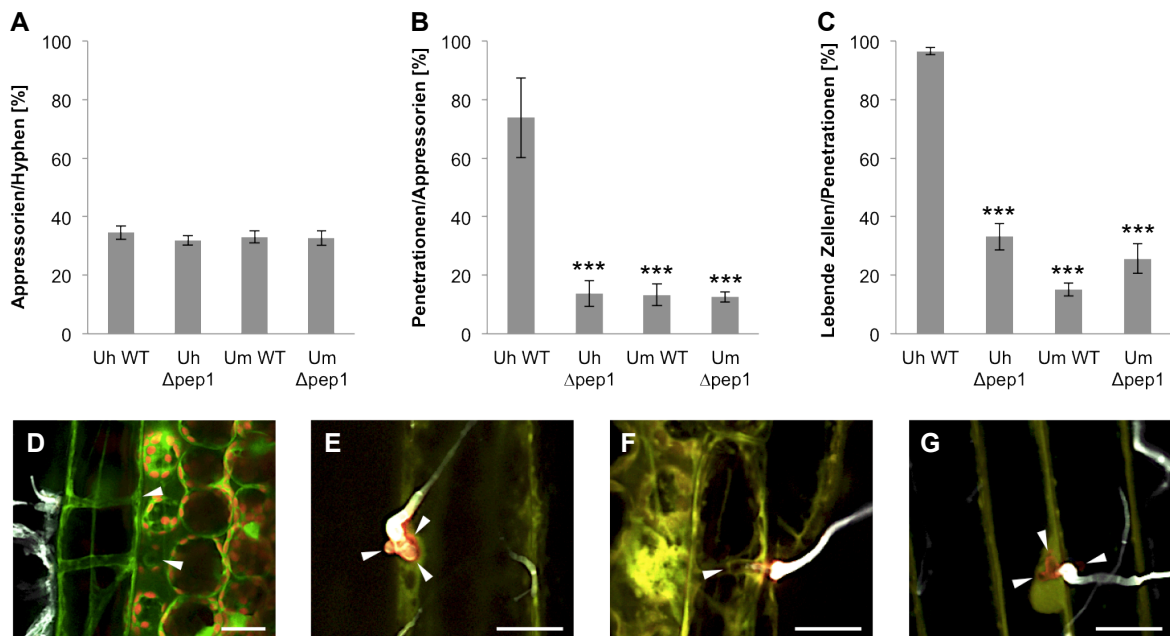


Abb. 15: Grundlagen der inkompatiblen Interaktion von Gerste mit *U. maydis* und *pep1*-Deletionsmutanten. Mikroskopische Analyse inkompatibler Interaktionen im *Ustilago*/Gerste-Pathosystem. **A**, Quantifizierung der Appressorienbildung auf der Blattoberfläche. 20 hpi bildet bei allen *Ustilago*-Stämmen etwa jedes dritte dikaryotische Filament ein Appressorium aus (*U. hordei*: 34,6%, n=697; *U. hordei* $\Delta pep1$: 31,9%, n=516; *U. maydis*: 33,1%, n=742; *U. maydis* $\Delta pep1$: 32,7%, n=579); **B**, Quantifizierung der Penetrationseffizienz. Im Gegensatz zur *U. hordei*-Infektion resultieren 30 hpi nur etwa 13-14% der ausgebildeten Appressorien der $\Delta pep1$ -Stämme und *U. maydis* in einer erfolgreichen Penetration (*U. hordei*: 73,8%, n=149; *U. hordei* $\Delta pep1$: 13,7%, n=197; *U. maydis*: 13,2%, n=219; *U. maydis* $\Delta pep1$: 12,6%, n=333); **C**, Quantifizierung der Zellviabilität. Während 48 hpi 96,5% der durch *U. hordei* penetrierten Zellen als lebend identifiziert werden konnten, war dies nach *U. hordei* $\Delta pep1$ -Infektion nur bei 33,1% (n=56), nach *U. maydis* $\Delta pep1$ -Infektion nur bei 25,7% (n=60) und nach *U. maydis*-Infektion sogar nur bei 15,1% (n=103) der Fall. Penetrationseffizienz und Zellviabilität sind in den inkompatiblen Interaktionen folglich signifikant reduziert. Die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei biologischen Replikaten; *** $P \leq 0,0005$ (ungepaarter *t*-Test). **D-G**, Konfokalmikroskopische Aufnahmen penetrierter Epidermiszellen 30 h nach Infektion durch *U. hordei* (D), *U. hordei* $\Delta pep1$ (E), *U. maydis* (F) und *U. maydis* $\Delta pep1$ (G) (FDA/FM4-64/Calcofluor-Färbung). Pilzhyphen auf der Blattoberfläche sind in weiß, Pflanzencytoplasma in grün und die pflanzliche Cytoplasmamembran in rot dargestellt; Pfeilspitzen markieren die penetrierte Hyphenspitze. Maßstab: 20 μ m. Die Daten für die *U. hordei*-Infektion aus A-C, sowie die zugehörige mikroskopische Aufnahme (D) wurden bereits in Abb. 8 gezeigt und dienen hier dem direkten Vergleich. Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

$\Delta pep1$ -Stämme, tendenziell weiter in die jeweilige Epidermiszelle vordringen konnten (Abb. 15 F). Auch die Anzahl an vitalen Zellen war 48 hpi für alle drei inkompatiblen Interaktionen signifikant geringer als in der kompatiblen Interaktion mit *U. hordei*. So betrug die Zellviabilität für die Wildtyp-Infektion mehr als 96%, während nach Infektion mit *U. hordei* $\Delta pep1$ nur 33%, nach Infektion mit *U. maydis* $\Delta pep1$ nur knapp 26% und nach *U. maydis*-Infektion sogar nur 15% der penetrierten Zellen vital waren (Abb. 15 C). Die makroskopischen Infektionssymptome der Gersteninfektionen wurden 6 dpi betrachtet. Hierbei hat sich gezeigt, dass die *U. hordei*-Infektion lediglich die bereits beschriebenen leichten chlorotischen Läsionen hervorruft (Abb. 8 A und Abb. 16). Trotz des induzierten

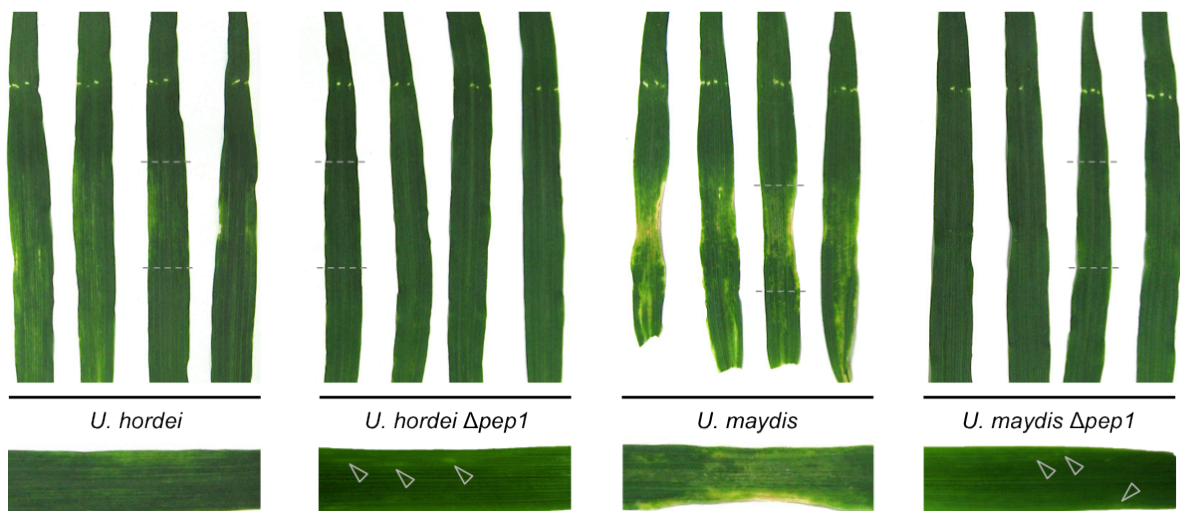


Abb. 16: Makroskopische Auswirkungen inkompatibler Interaktionen. 6 dpi zeigen sich die Auswirkungen der Pilzinfektionen anhand verschiedener makroskopischer Symptome. Im Vergleich zu den leichten chlorotischen Läsionen der *U. hordei*-Infektion wird die inkompatible Interaktion mit den $\Delta pep1$ -Mutanten lediglich durch vereinzelte chlorotische Punkte sichtbar (Pfeilspitzen). Eine Infektion mit *U. maydis* führt hingegen zu massiven Immunreaktionen in Form von fortlaufenden Chlorosen und nekrotischen Läsionen. Die grauen Linien markieren den für die Detailansicht (unten) ausgewählten Bereich der Übersichtsdarstellung (oben).

Zelltods und der geringen Zellviabilität sind nach Infektion mit *U. hordei* $\Delta pep1$ und *U. maydis* $\Delta pep1$ nur vereinzelte chlorotische Punkte im infizierten Blattbereich erkennbar (Abb. 16). Nach Infektion mit *U. maydis* zeigt sich 6 dpi hingegen eine deutlich sichtbare Zelltodantwort, die sich in flächendeckender Chlorose und teilweise starken nekrotischen Läsionen äußert (Abb. 16). Gleichzeitig ist diese Immunantwort nicht nur auf den Bereich der Infektion beschränkt, sondern führt sich bis zur Basis der Blattspreite fort. Zusätzlich ist oftmals nicht ausschließlich das infizierte dritte Blatt, sondern ebenfalls das vierte Blatt betroffen, obwohl dieses in der Regel keine Einstichstellen der Nadelinfektion zeigt (nicht gezeigt). Zudem wird deutlich, dass die mit *U. maydis* infizierten Gerstenblätter deutlich kürzer sind als die der anderen Infektionen. Daher wurde untersucht, ob die Pilzinfektionen ein retardiertes Blattwachstum hervorrufen. Hierfür wurde die Länge der infizierten Blattspreite von der Ligula bis zu den Einstichstellen der Nadelinfektion 6 dpi vermessen, wodurch bestätigt werden konnte, dass sich eine Pilzinfektion negativ auf das Pflanzenwachstum auswirkt. Bei Pflanzen die lediglich mock-infiziert wurden, maß das dritte Blatt von der Ligula bis zur Einstichstelle durchschnittlich 12,7 cm (Abb. 17). Blätter die mit einer der *Ustilago*-Suspensionen infiziert wurden, waren hingegen signifikant kleiner. So waren Blätter nach Infektion mit *U. hordei*, *U. hordei* $\Delta pep1$ und *U. maydis* $\Delta pep1$ mit durchschnittlich etwa 9,5 cm jeweils ca. 3 cm kürzer. Ähnlich der makroskopischen Symptome zeigte sich auch bei der Blattlänge der dramatischste Effekt nach *U. maydis*-Infektion. Aufgrund der starken Zelltodsymptome wurden die infizierten

Blätter nur etwa 6,7 cm lang (Abb. 17). Der durch die Pilzinfektion verursachte Stress resultiert folglich in einer Wachstumsretardation der betroffenen Blätter, deren Ausprägung in Relation zu den makroskopisch beobachteten Infektionssymptomen steht.

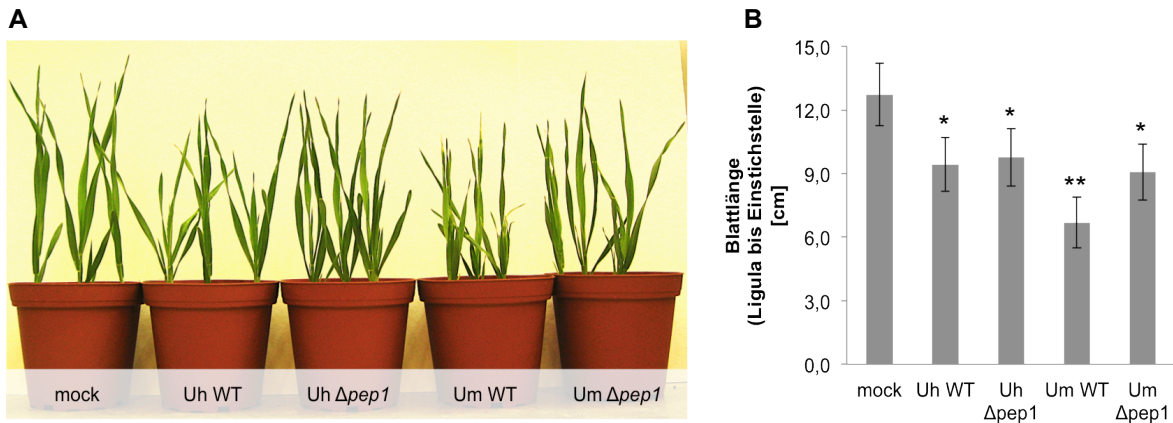


Abb. 17: Wachstumsretardation durch Pilzinfektion. Infizierte Gerstenpflanzen zeigen eine Hemmung des Blattwachstums. **A**, Optischer Vergleich zwischen den infizierten Pflanzen und mock-infizierten Kontrollpflanzen. **B**, Quantifizierung der Blattlänge des infizierten dritten Blattes (gemessen von der Ligula bis zur Einstichstelle durch die Nadelinfektion). Infizierte Pflanzen sind signifikant kleiner als die entsprechenden Kontrollpflanzen und es zeigt sich eine Abhängigkeit zur Stärke der ausgelösten Immunreaktionen. Dementsprechend ruft die Infektion mit *U. maydis* die größte Wachstumsverzögerung hervor und infizierte Pflanzen sind mit durchschnittlich 6,7 cm (n=53) nur gut halb so groß wie die mock-infizierten Kontrollpflanzen mit 12,7 cm (n=59). Infektionen mit *U. hordei* (9,4 cm; n=53), *U. hordei* $\Delta pep1$ (9,8 cm; n=53) und *U. maydis* $\Delta pep1$ (9,1 cm; n=53) zeigen einen vergleichbaren Effekt auf das Blattwachstum und sind ca. 3 cm kleiner als Kontrollpflanzen. Die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei biologischen Replikaten; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,005$ (ungepaarter *t*-Test).

Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

2.3.2 Einfluß von Bax Inhibitor-1 auf die epidermale Resistenz von Gerste

Pflanzen-Homologe des konservierten Zelltods Suppressors Bax Inhibitor-1 (BI-1) wurden bislang in mehreren Studien beschrieben. Für das *U. maydis*/Mais-Pathosystem konnte gezeigt werden, dass ZmBI-1 infolge einer Infektion transkriptionell induziert wird und als wichtiger Kompatibilitätsfaktor fungiert (Doehlemann et al., 2008b; van der Linde, 2011). Gleiches gilt für die Interaktion von Gerste und *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, dem Erreger des Gerstenmehltau (Hückelhoven et al., 2003; Eichman et al., 2010). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Überexpression von *HvBI-1* in Gerste neben einer partiellen Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Ascomyceten *Fusarium graminearum* auch eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber dem Nicht-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Weizenmehltau) vermittelt (Eichmann et al., 2004; Babaeizad et al., 2009). Durch die Suppression von PCD ist HvBI-1 demnach in der Lage einem nicht adaptierten Pathogen das Eindringen ins Wirtsgewebe zu ermöglichen.

Um zu untersuchen ob HvBI-1, im Folgenden als BI-1 bezeichnet, auch eine Rolle während der inkompatiblen Interaktionen von Gerste mit *U. maydis* bzw. den $\Delta pep1$ -Mutanten spielt, wurden *BI-1*-überexprimierende Pflanzen mit Sporidiensuspensionen der verschiedenen Stämme nach Standardmethode infiziert. Zur Bestimmung der Penetrationseffizienz wurden die mittels PCR auf Transgenität überprüften Pflanzen 30 hpi mit FDA, FM4-64 und Calcofluor gefärbt. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei nicht um einen Linien-spezifischen Effekt handelt, wurden alle drei zur Verfügung stehenden Überexpressionslinien (*BI-1* ÜE-Linien; E4L3, E14L1, E15L7) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *BI-1* keinen Einfluss auf die Penetrationseffizienz von *U. hordei* nimmt und jeweils durchschnittlich zwischen 68 und 77% der ausgebildeten Appressorien zur Penetration der Epidermis führen (Abb. 18). Ähnliches ließ sich nach Infektion mit *U. hordei* $\Delta pep1$ und *U. maydis* $\Delta pep1$ beobachten, denn auch hier führte die Überexpression von *BI-1* zu keiner Veränderung erfolgreicher Penetrationen durch den jeweiligen *Ustilago*-Stamm (Abb. 18). Interessanterweise vermitteln die transgenen Pflanzen jedoch eine signifikant gesteigerte Penetrations-

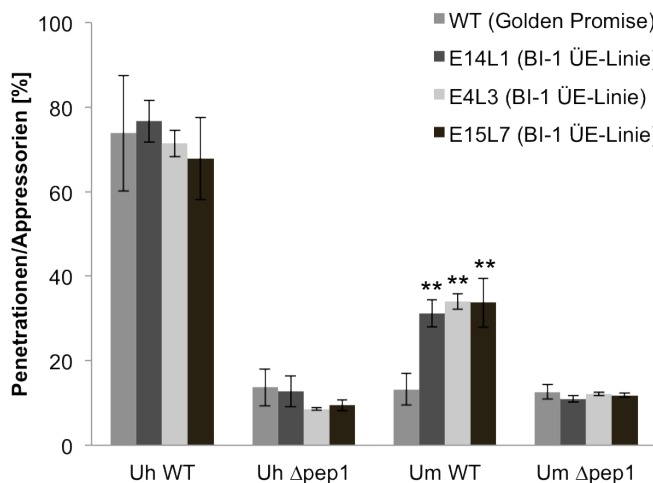


Abb. 18: Einfluss von BI-1 auf die Penetrationseffizienz. Quantifizierung der Penetrationseffizienz auf den BI-1 ÜE-Linien im Vergleich zur Ausgangsvarietät. Während die Rate erfolgreicher Penetrationen bei *U. hordei* (67,9-76,7%) und den $\Delta pep1$ -Stämmen (*U. hordei* $\Delta pep1$: 8,6-13,7%; *U. maydis* $\Delta pep1$: 11-12,6%) keine Änderung gegenüber WT-Gerste zeigen, ist die Penetrationseffizienz von *U. maydis* auf allen BI-1 ÜE-Linien signifikant erhöht (WT: 13,2%, n=219; E14L1: 31,3%, n= 224; E4L3: 34,0%, n=103; E15L7: 33,7%, n=83). Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei biologischen Replikaten; ** P \leq 0,005 (ungepaarter t-Test). Die Werte für WT-Gerste sind bereits in Abb. 16 B gezeigt. Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

effizienz gegenüber *U. maydis* und erfolgreiche Penetrationsvorgänge sind in mehr als 30% der Fälle zu beobachten (Abb. 18). Die Überexpression von *BI-1* nimmt demnach keinen Einfluss auf die Infektionen mit den *pep1*-Deletionsmutanten, sorgt aber während der Nicht-Wirt-Interaktion von *U. maydis* und Gerste, genau wie nach Infektion mit Weizenmehltau, für einen partiellen Verlust der epidermalen Resistenz.

Zur detaillierteren Analyse der Interaktion von *U. maydis* und BI-1 ÜE-Gerste wurden Pflanzen der Linie E14L1, sowie Pflanzen der Ausgangslinie ‚Golden Promise‘ mit *U. maydis* infiziert und infizierte Blattbereiche 24 hpi mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. DAB ist ein weit verbreitetes Peroxidase-Substrat

und dient dem Nachweis von H_2O_2 . Da eine HR den Tod der betroffenen Zellen einschließt, wurden infizierte Blattbereiche parallel mit Trypanblau angefärbt. Dieser anionische Azofarbstoff bindet an Zellproteine und eignet sich zur Vitalfärbung da er nicht membrangängig und somit spezifisch für tote Zellen ist, welche eine blaue Färbung zeigen. Zur Visualisierung des Pilzes wurden die Blätter zusätzlich mit Calcofluor (DAB) oder WGA-AF488 (Trypanblau) angefärbt.

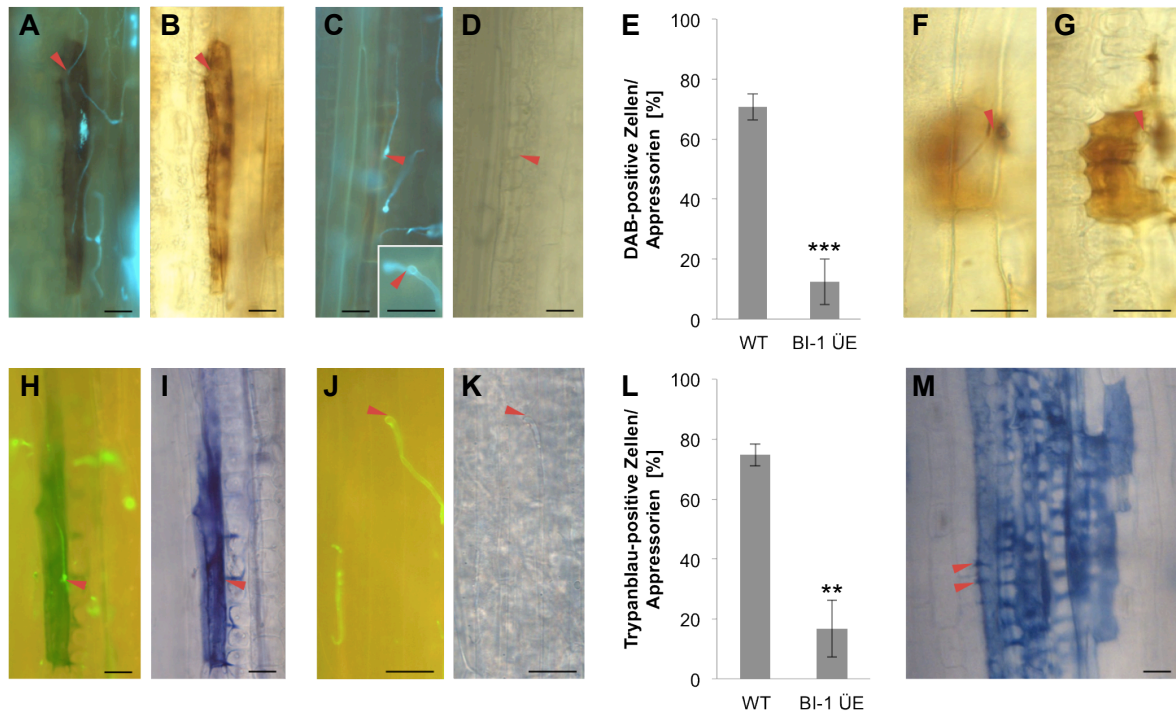


Abb. 19: Auswirkungen der *BI-1*-Überexpression auf die *U. maydis*/Gerste-Interaktion. Mikroskopische Untersuchungen der Pflanzenantwort auf *U. maydis*-Infektion. **A-D**, DAB/Calcofluor-Färbung von Wildtyp-Gerste (A-B) und *BI-1* ÜE-Gerste (C-D) 24 hpi. Während die Penetration durch *U. maydis* zur massiven Akkumulation von ROS und dementsprechend DAB-Präzipitat bei Wildtyp-Gerste führt, wird keine vergleichbare Immunantwort in der *BI-1* ÜE-Linie ausgelöst. Pilzhyphen auf der Blattoberfläche sind in weiß dargestellt (A und C); DAB-Präzipitate sind in einer Durchlichtaufnahme dargestellt (B und D). **E**, Quantifizierung DAB-positiv markierter Zellen in Relation zu ausgebildeten Appressorien 24 hpi. Während 70,7% aller Appressorien (n=90) in einer H_2O_2 -Antwort der attackierten Wildtyp-Zelle enden, ist diese Reaktion in *BI-1* ÜE-Pflanzen signifikant reduziert und nur 12,4% der Zellen (n=51) DAB-positiv. **F-G**, DAB-Färbung von *BI-1* ÜE-Gerste 48 hpi. Zwar zeigt die penetrierte Epidermiszelle keine Abwehrreaktionen (F), die im Mesophyllgewebe induzierte Immunantwort führt jedoch zu DAB-Präzipitat durch Peroxidase-Aktivität (G) (Durchlichtaufnahmen). **H-K**, Trypanblau/WGA-AF488-Färbung von Wildtyp-Gerste (H-I) und *BI-1* ÜE-Gerste (J-K) 24 hpi. Immunreaktionen als Antwort auf *U. maydis*-Infektion führen bei Wildtyp-Pflanzen zu PCD und damit verbundener Blaufärbung der attackierten Zelle. Die Zelltodsunterdrückung durch *BI-1* verhindert in *BI-1* ÜE-Pflanzen das Sterben der betroffenen Zelle. Pilzhyphen sind in grün dargestellt (H und J); Trypanblau-Färbungen sind in einer Durchlichtaufnahme dargestellt (I und K). **L**, Quantifizierung Trypanblau-positiv markierter Zellen in Relation zu ausgebildeten Appressorien 24 hpi. Ein Absterben der attackierten Zelle erfolgt bei Wildtyp-Pflanzen in 74,7% der Fälle (n=48), was jedoch durch *BI-1*-Überexpression auf 16,8% (n=131) reduziert wird. **M**, Trypanblau-Färbung von *BI-1* ÜE-Gerste 48 hpi. Ähnlich der DAB-Färbung (F-G) zeigt die Trypanblau-Färbung Abwehr-induzierten Zelltod im Mesophyllgewebe des infizierten Blatts. Pfeilspitzen markieren die jeweilige Penetrationsstelle; die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei biologischen Replikaten; ** $P \leq 0,005$; *** $P \leq 0,0005$ (ungepaarter *t*-Test); Maßstab: 20 μ m. Die erhobenen Daten und gezeigten Aufnahmen wurden von Gunther Döhlemann zur Verfügung gestellt. WT: Wildtyp-Gerste.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Wildtyp-Gerste mit *U. maydis* zu HR-induziertem Zelltod führt, da infizierte Zellen sowohl DAB-Präzipitation, als auch Blaufärbung zeigen (Abb. 19 A, B und H, I), was zu den in Kap. 2.3.1 beschriebenen Beobachtungen passt. Hingegen wurden nach Infektion transgener Pflanzen nur vereinzelt DAB- und Trypanblau-positive Zellen verzeichnet (Abb. 19 C, D und J, K). Insgesamt zeigten nur 12,4% der penetrierten BI-1 ÜE-Zellen DAB-Präzipitation, während dies bei Wildtyp-Pflanzen in 70,7% der infizierten Zellen der Fall war (Abb. 19 E). Trypanblau färbte lediglich 16,8% der attackierten BI-1 ÜE-Zellen, während dies nach Infektion von Wildtyp-Gerste für 74,7% zutrifft (Abb. 19 L). Die Überexpression von *BI-1* führt folglich zu einer signifikanten Unterdrückung der H₂O₂-Bildung und Zelltod in der Nicht-Wirts-Interaktion mit *U. maydis*. Mikroskopische Analysen infizierter Blätter 48 hpi haben allerdings gezeigt, dass *U. maydis* auch in BI-1 ÜE-Pflanzen erkannt und abgewehrt wird. Diese Immunreaktion erfolgt jedoch erst im Mesophyllgewebe, was wiederum durch DAB-Präzipitation und Trypanblau-Färbung gezeigt werden konnte. Die epidermale HR kann somit durch Überexpression von *BI-1* unterdrückt werden, die Immunabwehr im Mesophyll wird dagegen nicht beeinflusst.

Durch Färbung der Pilzhyphen konnte gezeigt werden, dass bei der Infektion von Wildtyp-Gerste die invasive Pilzhyphe in die Epidermiszelle eindringt, dort erkannt wird und durch induzierte Abwehrreaktionen direkt blockiert wird, was ebenfalls mit massiver Autofluoreszenz der Pflanzenzellen einhergeht (Abb. 20 A und B). Die Unterdrückung der epidermalen Abwehr in BI-1 ÜE-Zellen führt hingegen dazu, dass die Hyphen das Mesophyllgewebe erreichen und dabei beginnen sich zu verzweigen (Abb. 20 C und D).

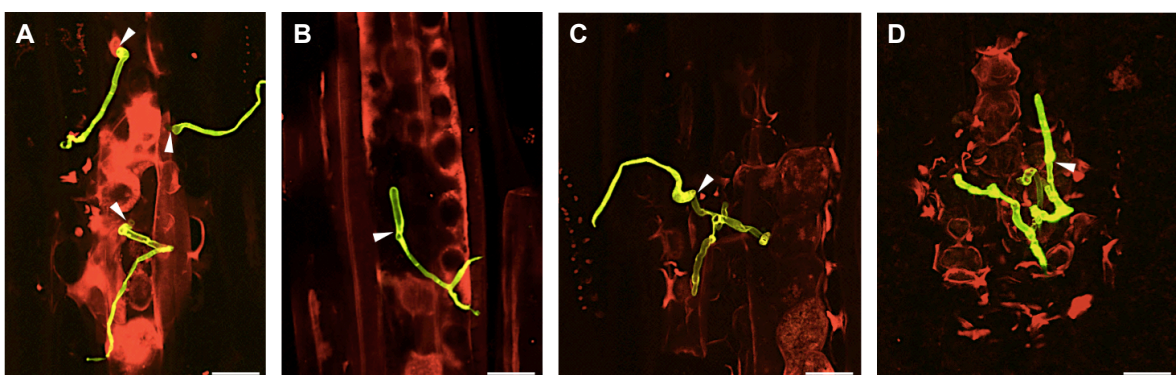


Abb. 20: Intrazelluläres Wachstum von *U. maydis* auf Gerste durch *BI-1*-Überexpression. WGA-AF488/PI-Färbung *U. maydis*-infizierter Blätter von Wildtyp- und BI-1 ÜE-Gerste 48 hpi. Während die invasive Hyphe in Wildtyp-Zellen unmittelbar nach der Penetration erkannt und durch das pflanzliche Immunsystem innerhalb der Epidermiszelle blockiert wird (A und B), erfolgt die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen in BI-1 ÜE-Gerste später, wodurch *U. maydis* in der Lage ist bis ins Mesophyllgewebe vorzudringen und Hyphenverzweigungen auszubilden (C und D). Die Induktion der Pflanzenabwehr geht in beiden Fällen mit sehr starker Autofluoreszenz einher. Pilzhyphen sind in grün, Pflanzenzellen in rot dargestellt; Pfeilspitzen markieren die jeweilige Penetrationsstelle; Maßstab: 20 µm.

Dies bedeutet, dass der während der Penetration bestehende Zellzyklus-Arrest aufgehoben wurde, was ein Zeichen für eine etablierte biotrophe Interaktion ist.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Überexpression des konservierten Zelltods Suppressors Bax Inhibitor-1 die epidermale Nicht-Wirts-Resistenz gegenüber *U. maydis* unterdrückt. Diese Interaktion kann jedoch im Mesophyll nicht aufrechterhalten werden. Interessanterweise nimmt die *BI-1*-Überexpression jedoch keinen Einfluss auf die inkompatible Interaktion und die damit verbundenen Immunreaktionen bei Infektionen mit den *U. hordei* oder *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutanten.

2.4 Determination der beteiligten Zelltod-Mechanismen

Die Tatsache, dass Bax Inhibitor-1 in der Lage ist durch *U. maydis* hervorgerufenen programmierten Zelltod effizient zu unterdrücken, jedoch keinen Einfluss auf den induzierten Zelltod nach Infektion einer $\Delta pep1$ -Mutante hat, legt nahe, dass die jeweilige Zelltodantwort auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Zwar handelt es sich jeweils um Zelltod der aus einer inkompatiblen Interaktion resultiert, jedoch wird diese durch unterschiedliche Pathogentypen verursacht. Während es sich bei *U. maydis* um ein Nicht-Wirt-Pathogen handelt, liegt bei *U. hordei* $\Delta pep1$ lediglich eine Modifikation des eigentlich adaptierten Pathogens in Form einer Effektordeletion vor. Die *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante trägt sowohl die Effektordeletion und ist gleichzeitig Nicht-Wirt-Pathogen, bezüglich des induzierten Zelltods verhält sie sich jedoch wie *U. hordei* $\Delta pep1$. Zur besseren Differenzierung der möglicherweise unterschiedlichen Modi, sollten auf Basis der vorangegangenen Untersuchungen mit Hilfe verschiedener mikroskopischer und enzymatischer Ansätze Anhaltspunkte gefunden werden, die es ermöglichen zwischen unterschiedlichen Arten an programmiertem Zelltod zu unterscheiden. In Anlehnung an die beschriebenen PCD-Arten in tierischen Systemen wurden hierfür primär Apoptose-ähnlicher Zelltod und Autophagie in Betracht gezogen.

2.4.1 Infektionen mit *U. maydis* induzieren Apoptose-ähnlichen Zelltod

Mehrere Studien konnten bereits bestätigen, dass Zelltod in Pflanzenzellen, der durch heterologe Expression des pro-apoptotischen Faktors Bax induziert wird, durch gleichzeitige Expression von Bax Inhibitor-1 supprimiert oder signifikant reduziert werden kann (Kawai-Yamada et al., 2001; Wang et al., 2012). Daher fungiert BI-1 nicht nur als Regulatorprotein bei apoptotischem Zelltod in tierischen Zellen, sondern ist auch an Apoptose-ähnlichem Zelltod in Pflanzen beteiligt. Da die epidermale Immunantwort auf *U. maydis*-Infektion in *BI-1*-überexprimierenden Gerstenpflanzen ausbleibt, liegt die

Vermutung nahe, dass es sich bei der Nicht-Wirt-Resistenz um Apoptose-ähnlichen Zelltod handelt.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde ein enzymatischer Caspase-Aktivitätstest mit Blattextrakten durchgeführt. Zwar konnten Caspasen als solche in Pflanzen noch nicht identifiziert werden, jedoch wurde Caspase-ähnliche Enzymaktivität ('*caspase-like activity*') bereits mehrfach beschrieben (del Pozo und Lam, 1998; Zhang et al., 2009; Fernández et al., 2012). Zur Bestimmung einer solchen Enzymaktivität wurden 10 Tage alte Gerstenpflanzen nach Standardmethode mit Suspensionen der zu testenden *Ustilago*-Stämme, sowie einer mock-Kontrolle infiziert, um 12 und 30 hpi Proteinextrakte der infizierten Blattbereiche herzustellen. Zur spezifischen Detektion der sogenannten DEVDase-Aktivität, wurden die verschiedenen Proteinextrakte mit Ac-DEVD-MCA inkubiert, einem selektiven und Fluoreszenzmarkierten Substrat, welches durch die Effektor-Caspase-3 gespalten wird. Durch diese Prozessierung wird der fluorogene Teil des Substrats frei und das entstehende Fluoreszenzsignal kann spektrofluorometrisch gemessen werden. Basierend auf einer einstündigen Kinetik wurde folglich der Anstieg

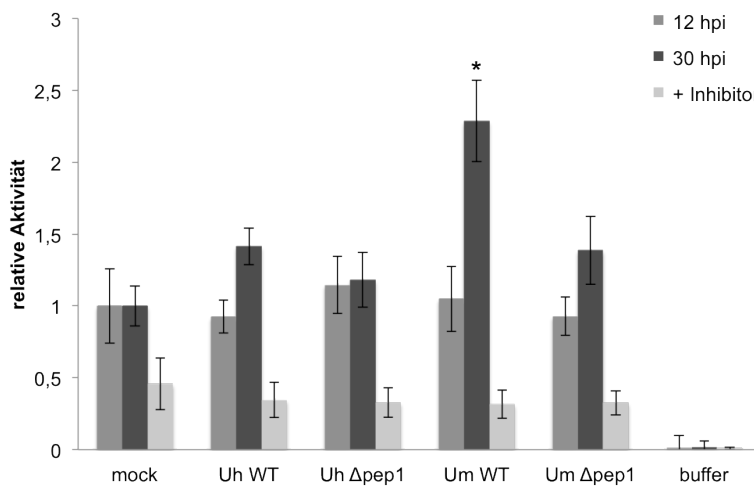


Abb. 21: Caspase-Aktivitätstest nach *Ustilago*-Infektion. Bestimmung der Caspase-ähnlichen Enzymaktivität (DEVDase) in Proteinextrakten infizierter Blattbereiche mittels des spezifischen Fluoreszenz-Substrats Ac-DEVD-MCA. Während 12 hpi keine DEVDase-Aktivität im Vergleich zur mock-Kontrolle zu verzeichnen ist, kommt es 30 hpi zu einer signifikanten Induktion der Substratspaltung in Extrakten *U. maydis*-infizierter Blätter. Extrakte $\Delta pep1$ - und *U. hordei*-infizierter Blätter hingegen zeigen keine spezifische Induktion. Die gemessene Aktivität kann in allen Extrakten durch einen spezifischen Inhibitor größtenteils blockiert werden. Die relative Aktivität in Extrakten mock-infizierter Blätter 12 und 30 hpi wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen den SEM aus mindestens drei biologischen Replikaten; * $P \leq 0,05$ (ungepaarter *t*-Test). Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

der Fluoreszenz ermittelt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass 12 hpi, wenn die *Ustilago*-Stämme zwar filamentös wachsen, die Blattoberfläche jedoch noch nicht penetriert haben, keine Induktion der DEVDase-Aktivität im Vergleich zu mock-infizierten Blättern zu verzeichnen ist (Abb. 21). 30 hpi kann hingegen ein signifikanter Anstieg der Substratspaltung in Proteinextrakten *U. maydis*-infizierter Blätter verzeichnet werden. Dieser zeigt im Vergleich zur basalen Aktivität nach 12 Stunden auf eine mehr als doppelt so hohe Aktivität. Extrakte *U. hordei*-

und $\Delta pep1$ -infizierter Blätter zeigten jedoch nur einen marginalen, nicht signifikanten Anstieg der Aktivität 30 hpi. Um sicherzustellen, dass es sich bei der gemessenen Aktivität spezifisch um DEVDase-Aktivität handelt, wurden die Proteinextrakte parallel mit dem korrespondierenden Inhibitor-Peptid Ac-DEVD-CHO inkubiert, wodurch in allen Extrakten die Substratspaltung größtenteils blockiert wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass spezifisch nach *U. maydis*-Infektion die Caspase-ähnliche DEVDase-Aktivität induziert wird, einem Indiz für Apoptose-ähnlichen Zelltod.

2.4.2 Abwehrreaktionen gegenüber $\Delta pep1$ -Mutanten führen zu Autophagie

Da Autophagie ebenfalls als Mechanismus zur Induktion von programmiertem Zelltod diskutiert wird und sich unter anderem durch das Fehlen der spezifischen Caspase-Aktivität definiert, wurde überprüft, ob dieser Prozess an der Inkompatibilität gegenüber *pep1*-Deletionsmutanten beteiligt ist.

Hierfür wurden infizierte Zellen in einem mikroskopischen Ansatz auf die An- bzw. Abwesenheit der für Autophagie charakteristischen Autophagosomen untersucht. Mittels

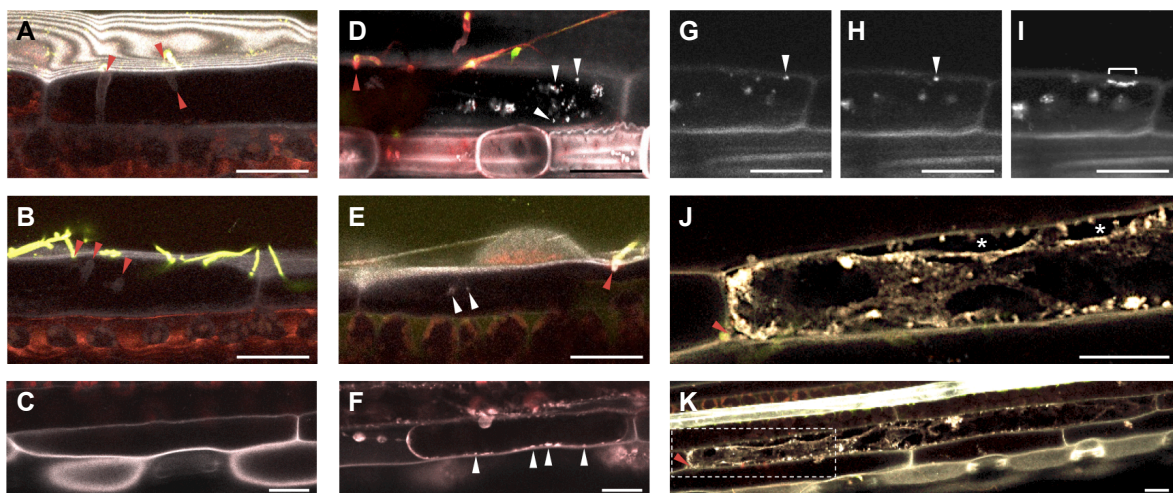


Abb. 22: Visualisierung von Autophagosomen. MDC/FM4-64/WGA-AF488-Färbung *Ustilago*-infizierter Gerstenblätter zur Analyse von Autophagie-Induktion. **A-C**, 30 hpi können weder in *U. hordei*- (A), noch in *U. maydis*-infizierten Epidermiszellen (B) autophagische Vesikel identifiziert werden. Mock-infizierte Kontrollpflanzen zeigen ebenfalls keine Anhaltspunkte für Autophagie (C). **D-E**, Zellen die durch *U. hordei* $\Delta pep1$ (D) oder *U. maydis* $\Delta pep1$ (E) attackiert wurden führen hingegen zur Akkumulation von Autophagosomen. **F**, Plasmolytische Zelle (mock-infiziert) bei der durch Salzstress Autophagie induziert wurde, zeigt typische autophagische Vesikel im Cytoplasma und dient als Positivkontrolle. **G-I**, Autophagie-positive Zelle nach *U. hordei* $\Delta pep1$ -Attacke zeigt per Zeitaufnahme motile Autophagosomen die sich im pflanzlichen Cytoplasma bewegen (G, Beginn der Aufnahme; H, Ende der Aufnahme; I, Überlagerung aller Einzelaufnahmen). **J-K**, *U. hordei* $\Delta pep1$ -infizierte Zelle 48 hpi, bei der neben einer starken Akkumulation an aziden Vesikeln auch massive Veränderungen der intrazellulären Strukturen, wie zum Beispiel das Ablösen der Cytoplasmamembran von der pflanzlichen Zellwand (*) zu verzeichnen sind. Trotz der Eliminierung dieser Zelle bleiben umliegende Zellen intakt und zeigen keinerlei Beeinflussung durch den induzierten Zelltod (J zeigt eine Vergrößerung des in K gekennzeichneten Bildausschnitts). Autophagosomen und Zellwände sind in weiß, Pilzhyphen in grün und pflanzliche Membranen in rot dargestellt; rote Pfeilspitzen markieren Penetrationstellen und/oder intrazelluläre Pilzhyphen; weiße Pfeilspitzen kennzeichnen Autophagosomen. Maßstab: 25 μm .

Monodansylcadaverin (MDC), einem leicht basischen und dadurch membrangängigen Amid, welches sich in aziden Kompartimenten anreichert, kann Autophagie durch die Visualisierung von Autophagosomen sichtbar gemacht werden (Biederbick et al., 1995; Contento et al., 2005). Die zu untersuchenden Blätter wurden dazu 30 hpi durch Vakuuminfiltration mit einer Kombination aus MDC, FM4-64 und WGA-AF488 angefärbt, sodass gleichzeitig auch pflanzliche Membranen und die jeweiligen Pilzhyphen dargestellt werden konnten. Als Kontrolle wurde bei gefärbten, mock-infizierten Blättern durch 15-minütige Behandlung mit einer 1 M NaCl-Lösung Plasmolyse induziert. Der dadurch ausgelöste physiologische Salzstress dient wiederum als Bedingung zur effizienten Induktion von Autophagie. Hierbei konnten in plasmolytischen Epidermiszellen angefärbte Vesikel nachgewiesen werden, die sich entlang cytoplasmatischer Fäden bewegen. Solche Strukturen waren vor der Plasmolyse nicht zu beobachten (Abb. 22 C und F). Durch Färbung infizierter Blattbereiche wurde gezeigt, dass weder die Infektion durch *U. hordei* (Abb. 22 A), noch eine Penetration durch *U. maydis* (Abb. 22 B) zur Anreicherung autophagischer Vesikel in betroffenen Zellen führte. Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine Akkumulation von Autophagosomen sowohl in *U. hordei* $\Delta pep1$ -attackierten Zellen (Abb. 22 D), als auch in *U. maydis* $\Delta pep1$ -attackierten Zellen (Abb. 22 E) verzeichnet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die angefärbten Autophagosomen ebenfalls innerhalb des Cytoplasmas bewegen (Abb. 22 G-I). Die betroffenen Zellen sind demnach noch vital, was in den meisten Fällen nach 48 Stunden jedoch nicht mehr der Fall war. Hier konnten nach MDC/FM4-4/WGA-AF488-Färbung neben der starken Anreicherung positiv-markierter Vesikel auch drastische Veränderungen der zellulären Strukturen, wie beispielsweise das Ablösen der Cytoplasmamembran von der Zellwand, nachgewiesen werden (Abb. 22 J und K).

Mittels Quantifizierung von Zellen, die nach *Ustilago*-Infektion autophagische Vesikel anreichern, konnte zudem gezeigt werden, dass nach Infektion mit *U. hordei* in 5,5% und

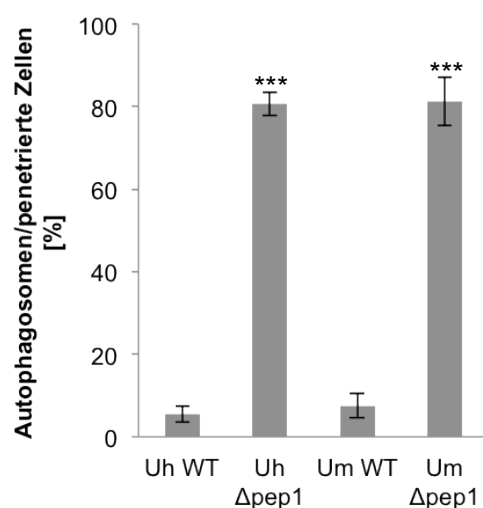


Abb. 23: Autophagie-Induktion in $\Delta pep1$ -infizierten Zellen. Quantifizierung der Zellen die nach *Ustilago*-Infektion eine Akkumulation von Autophagosomen zeigen. Während in *U. hordei*- und *U. maydis*-infizierten Zellen lediglich 5,5%, bzw. 7,6% als Autophagie-positiv identifiziert werden konnten, zeigen Penetrationsversuche durch die *U. hordei* oder *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante eine signifikante Induktion von Autophagie. Hier konnte bei *U. hordei* $\Delta pep1$ für 80,7% und bei *U. maydis* $\Delta pep1$ für 81,3% der Zellen eine Akkumulation von Autophagosomen bestätigt werden. Die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung aus mindestens drei biologischen Replikaten (n=60); *** P \leq 0,0005 (ungepaarter t-Test). Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

nach Infektion mit *U. maydis* in 7,5% der Zellen Autophagie induziert wird. Hingegen gehen Penetrationsversuche durch *U. hordei* $\Delta pep1$ und *U. maydis* $\Delta pep1$ jeweils in mehr als 80% der Fälle mit der Induktion von Autophagie einher (Abb. 23).

Somit konnte deutlich gezeigt werden, dass Autophagie spezifisch als Folge von Infektionen mit *pep1*-Deletionsmutanten induziert wird, während eine Akkumulation von Autophagosomen bei der Nicht-Wirt-Resistenz gegenüber *U. maydis* ausbleibt.

2.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie zeigt charakteristische Zelltodmerkmale

Mit dem Caspase-Aktivitätstest und der MDC-Färbung konnten zwei Indizien beschrieben werden die dafür sprechen, dass der induzierte Zelltod nach *U. maydis*-Infektion auf einem Apoptose-ähnlichen Mechanismus beruht und nach Penetrationsversuchen durch *pep1*-Deletionsmutanten Autophagie induziert wird.

Um diese Funde zu bestätigen wurden die zellulären Vorgänge nach *Ustilago*-Infektionen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) genauer untersucht. Hierfür wurden 10 Tage alte Gerstenpflanzen nach Standardmethode mit Sporidien suspensionen der jeweiligen *Ustilago*-Stämme infiziert und infizierte Blattbereiche nach 30 und 48 hpi zur TEM vorbereitet. Da bereits gezeigt werden konnte, dass es sowohl nach $\Delta pep1$ -Infektion, als auch nach Infektion mit *U. maydis* zu Produktion und Akkumulation von ROS kommt, wurden die Blattproben gleichzeitig mit einer Ceriumchlorid ($CeCl_3$)-Lösung behandelt. $CeCl_3$ bildet in Anwesenheit von H_2O_2 ein elektronendichtes Präzipitat, welches demzufolge in der TEM-Analyse detektiert werden kann und spezifisch die Anreicherung von ROS markiert (Bestwick et al., 1997; Wi et al., 2005). Die anschließenden TEM-Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Zechmann (Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich) durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Folge einer Infektion mit *U. hordei* eine erfolgreiche biotrophe Interaktion aufgebaut wird, in der keinerlei Veränderung in der Pflanzenzelle auftreten (Abb. 25 A und B). Wird eine Zelle hingegen durch die *U. hordei* $\Delta pep1$ -Mutante penetriert, kommt es in frühen Stadien zur Induktion von Autophagie und der Ausbildung von Autophagosomen (Abb. 25 C und D). Zudem wird die Zellwand verstärkt und Zellwandmaterial findet sich ebenfalls um die Pilzhyphe, was auf Papillenbildung hinweist. In diesem neu synthetisierten Zellwandmaterial finden sich dementsprechend $CeCl_3$ -Präzipitate (Abb. 25 C). In späteren Stadien zeigt sich der Verlust der penetrierten Zelle, deren Cytoplasma massiv degradiert ist (Abb. 25 D, Mitte). Im Gegensatz dazu konnten in *U. maydis*-infizierten Zellen keine Autophagosomen gezeigt werden. Hier wurden jedoch andere Zelltodmerkmale detektiert. Mittels der $CeCl_3$ -Behandlung konnte H_2O_2 -Akkumulation in der Zellwand, dem

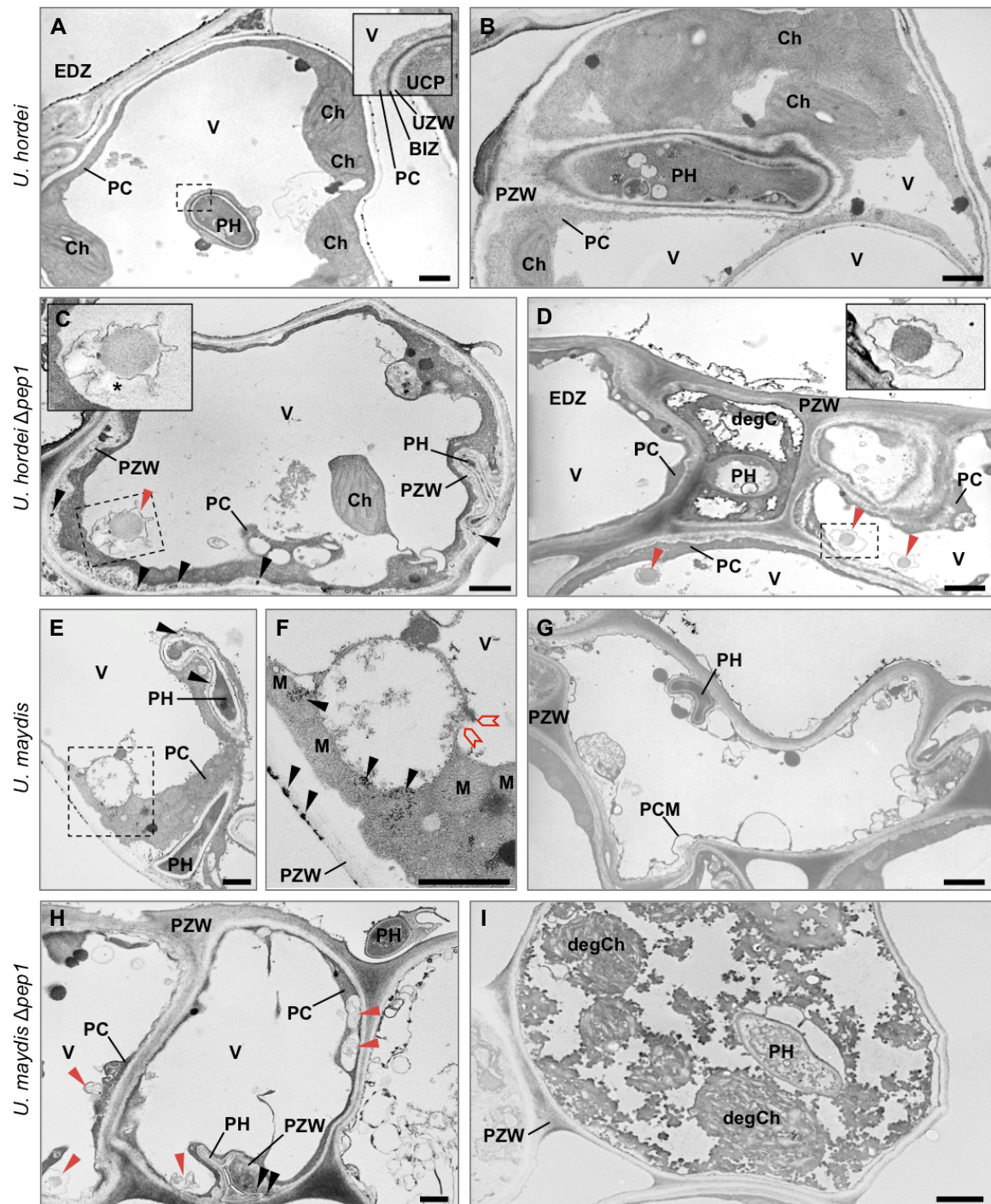


Abb. 24: Zelluläre Strukturen nach *Ustilago*-Infektion. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Gerstenzellen 30 und 48 hpi. **A-B**, *U. hordei*-infizierte Mesophyllzellen zeigen keinerlei strukturelle oder physiologische Auffälligkeiten. Der Pilz etabliert eine kompatible Interaktion mit der Wirtspflanze (das *Inset* zeigt die biotrophe Interaktionszone). **C-D**, *U. hordei* $\Delta pep1$ -infizierte Zellen zeigen für Autophagie charakteristische Autophagosomen (*Inset*). Zudem zeigt sich eine Verstärkung der Zellwand mit $CeCl_3$ -Präzipitaten und die Hyphe umgebendes Zellwandmaterial, was auf Papillenbildung schließen lässt (C). Kollabierte Zellen in späteren Stadien der Infektion zeigen eine massive Degradation des Zellinhaltes (D). **E-G**, In *U. maydis*-infizierten Zellen kann eine massive H_2O_2 -Akkumulation durch $CeCl_3$ -Färbung in Zellwand, Cytosol und Mitochondrien beobachtet werden. Zudem kommt es zur frühen Ruptur des Tonoplasten (E und F; F zeigt eine vergrößerte Darstellung des in E markierten Bereichs). In späten Stadien findet sich kein Zellinhalt mehr und die Cytoplasmamembran löst sich von der Zellwand und zeigt blasenartige Auswerfungen (G). **H-I**, *U. maydis* $\Delta pep1$ -infizierte Zellen zeigen ebenfalls Autophagosomen und Papillenbildung (H), während in späten Stadien der Zellinhalt komplett degradiert ist.

Fortsetzung Abb. 24: Rote Pfeilspitzen zeigen Autophagosomen; schwarze Pfeilspitzen markieren die Akkumulation von H_2O_2 in Form von $CeCl_3$ -Präzipitaten; rote Sparren zeigen den eingrissenen Tonoplast; schwarzes Sternchen in C zeigt die degradierende innere Autophagosomenmembran, wodurch der Vesikelinhalt in die Vakuole entlassen wird; gestrichelte Kästchen markieren die in *Insets* vergrößerten Bereiche; Maßstab: 1 μm . Abkürzungen: BIZ, biotrophe Interaktionszone; Ch, Chloroplast; degCh, degradiertes Chloroplast; degC, degradiertes Cytoplasma, EDZ, Epidermiszelle; M, Mitochondrium; PC, pflanzliches Cytoplasma; PCM, pflanzliche Cytoplasma-membran; PH, Pilzhyphe; PZW, Pflanzenzellwand; UCP, *Ustilago* Cytoplasma; UZW, *Ustilago* Zellwand; V, Vakuole. Alle Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Zechmann angefertigt.

Cytoplasma und insbesondere in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der Aktivierung von apoptotischem Zelltod mittels des Mitochondrium-basierten Kontrollmechanismus. Zudem zeigt sich eine frühe Ruptur des Tonoplasten, wodurch hydrolytische Enzyme ins Cytoplasma entlassen werden (Abb. 25 E und F), was in den anderen Infektionen nicht gezeigt werden konnte. Ein späteres Stadium einer *U. maydis*-Infektion zeigt eine vollständige Auflösung des Zellinhalts und eine sich von der Zellwand ablösende Cytoplasmamembran die blasenartig ausgeschlagen ist, was an 'membrane blebbing' erinnert (Abb. 25 G). Infektionen mit der *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante zeigen dieselben Charakteristika wie *U. hordei* $\Delta pep1$ -Infektionen. Auch hier konnten Autophagosomen und die Pilzhyphe umgebendes Zellwandmaterial gezeigt werden (Abb. 25 H). Ebenfalls zeigt ein spätes Stadium dieser Infektion eine eliminierte Pflanzenzelle mit völlig degradiertem Zellinhalt (Abb. 25 I).

TEM-Aufnahmen unterstützen folglich die in den vorangegangenen Versuchen dargelegte Vermutung, dass Infektionen mit *pep1*-Deletionsmutanten Autophagie induzieren, während *U. maydis*-Infektionen in Apoptose-ähnlichem Zelltod resultieren.

2.4.4 Die induzierten Abwehrreaktionen variieren in Zeitpunkt und Intensität

Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung der inkompatiblen *Ustilago*-Interaktionen wurden die Bildung von H_2O_2 und die transkriptionelle Aktivierung ausgewählter Abwehrgene untersucht.

Aufgrund ihrer Beteiligung während der Pflanzenabwehr und insbesondere während der HR wurden die Gene zweier SA-induzierter PR-Proteine (*PR1* und *PR10*), sowie drei WRKY-Transkriptionsfaktoren (*WRKY1*, *WRKY2* und *WRKY22*) hinsichtlich ihres Expressionsprofils getestet. Zudem konnte in den bisherigen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Infektion mit *pep1*-Deletionsmutanten neben Autophagie auch Papillenbildung induziert. Daher wurden ebenfalls eine Callose-Synthase, sowie vier *ATG*-Gene (*ATG5*, *ATG8*, *ATG9* und *ATG12*) auf ihre transkriptionelle Regulation untersucht.

Interessanterweise konnte trotz der eindeutigen Belege durch die TEM-Analyse weder eine transkriptionelle Induktion der Callose-Synthase, noch der getesteten *ATG*-Gene

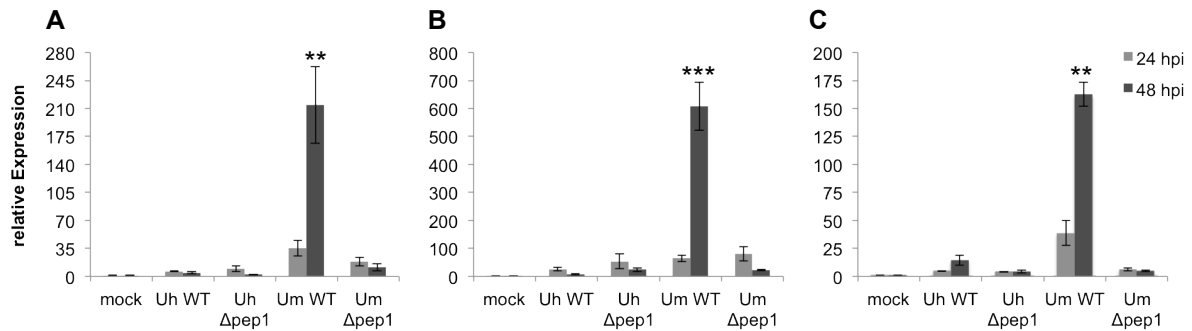


Abb. 25: Transkriptionelle Regulation Abwehr-relevanter Markergene. Durch quantitative *real-time* PCR ermittelte Genexpression von *PR1* (A), *PR10* (B) und *WRKY22* (C) während der *Ustilago*/Gerste-Interaktion 24 und 48 hpi. **A**, Relative Genexpression von *PR1*. 24 hpi liegt *PR1* im Vergleich zu mock-infizierten Blättern in allen Interaktionen leicht induziert vor, wobei die jeweilige Induktion nach 48 Stunden wieder rückläufig ist. Lediglich *U. maydis*-infizierte Blätter zeigen eine signifikante 214-fache Induktion von *PR1* 48 hpi. **B**, Relative Genexpression von *PR10*. Genau wie bei *PR1* lässt sich eine Induktion von *PR10* ebenfalls in allen Interaktionen 24 hpi beobachten, welche 48 hpi nach *U. hordei*- und $\Delta pep1$ -Infektion nur noch marginal vorhanden ist. *U. maydis* zeigt hier jedoch eine mehr als 600-fache Induktion. **C**, Relative Genexpression von *WRKY22*. Ähnlich wie die *PR*-Gene wird auch *WRKY22* 24 hpi durch *U. hordei*- und beide $\Delta pep1$ -Infektionen schwach induziert, während eine bereits knapp 40-fache Induktion in *U. maydis*-infizierten Blättern vorliegt. Diese steigert sich auf eine mehr als 160-fache Expression im Vergleich zur Kontrolle, während bei den anderen Infektionen keine deutlichen Veränderungen zu verzeichnen sind. Die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen den SEM aus mindestens drei biologischen Replikaten; ** $P \leq 0,005$; *** $P \leq 0,0005$ (ungepaarter *t*-Test). Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

bestätigt werden (nicht gezeigt). Ebenfalls zeigten *WRKY1* und *WRKY2* keinerlei differenzielle Regulation zwischen den Zeitpunkten und Interaktionstypen (nicht gezeigt). Hingegen konnte für *PR1*, *PR10* und *WRKY22* eine signifikante Induktion als Antwort auf die *U. maydis*-Infektion beschrieben werden, während sowohl die kompatible Interaktion mit *U. hordei*, als auch die inkompatiblen Interaktionen mit den $\Delta pep1$ -Mutanten keinen Einfluss zeigten (Abb. 25). Beide *PR*-Gene werden im Vergleich zu mock-infizierten Blättern 24 hpi in allen Interaktionen bis zu 35-fach (*PR1*) bzw. 80-fach (*PR10*) induziert (Abb. 25 A und B). Diese Induktion nimmt jedoch bei *U. hordei*- und $\Delta pep1$ -infizierten Blättern wieder ab und zeigt sich 48 hpi nur noch marginal, während nach *U. maydis*-Infektion *PR1* 214-fach und *PR10* mehr als 600-fach induziert vorliegen (Abb. 25 A und B). Ein ähnliches Bild beschreibt die Genexpression von *WRKY22*. Auch hier zeigt sich 24 hpi eine geringfügige Induktion nach Pathogenattacke durch *U. hordei* und die $\Delta pep1$ -Mutanten, wobei *U. maydis*-Infektion bereits zu einer knapp 40-fachen Expression im Vergleich zur mock-Infektion führt. 48 hpi zeigt diese eine mehr als 160-fache Induktion, während in den anderen Interaktionen keine deutlichen Veränderungen zu verzeichnen waren (Abb. 25 C). Somit geht die inkompatible Nicht-Wirt-Interaktion von Gerste mit *U. maydis* mit einer massiven Induktion HR-assoziiertes Gene einher, was dementsprechend auf eine hypersensitive Antwort der betroffenen Pflanzenzellen

schließen lässt. Vergleichbares konnte für die $\Delta pep1$ -Infektionen jedoch nicht bestätigt werden. Daher scheint der hier induzierte Zelltod nicht HR-assoziiert zu sein.

Die Analyse der quantitativen H_2O_2 -Antwort im Rahmen der Pflanzenabwehr gegenüber *Ustilago*-Infektionen erfolgte mittels eines auf Xylenolorange (XO)-basierenden kolorimetrischen Ansatzes. XO ist ein gelblicher Triphenylmethanfarbstoff der unter Komplexbildung mit mehrwertigen Metallionen ein rotviolettes Addukt bildet. Mit Hilfe eines Fe(II)Sulfat-haltigen Puffers kann die relative Menge H_2O_2 in einer Lösung bestimmt

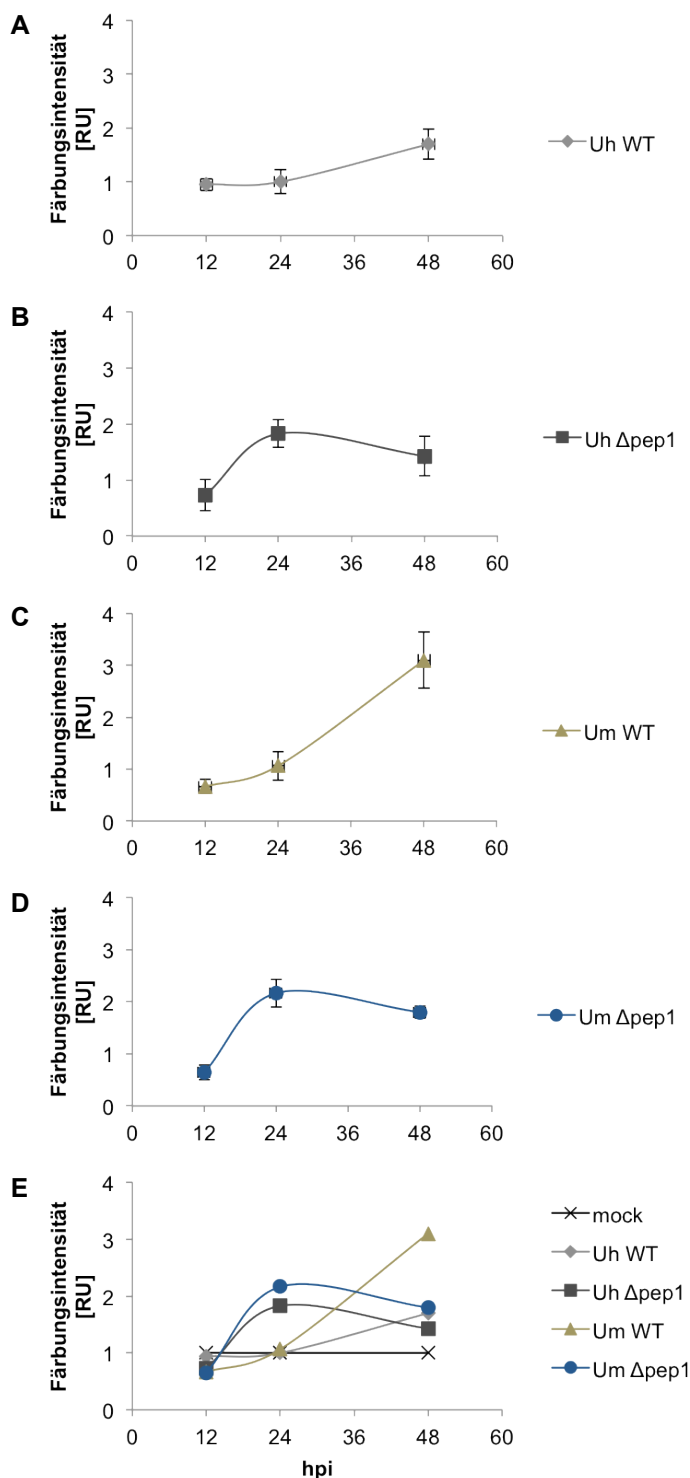


Abb. 26: Zeitpunkt und Ausmaß des 'oxidative burst' als Abwehrreaktion bei Inkompatibilität. Xylenolorange-Assay zur Untersuchung der quantitativen H_2O_2 -Antwort in Apoplastenflüssigkeit 12, 24 und 48 hpi. **A**, H_2O_2 -Produktion nach *U. hordei*-Infektion. Deutlich wird, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infektion keine H_2O_2 -Antwort stattfindet und die gemessenen Intensitäten denen der Apoplastenflüssigkeit aus mock-infizierten Blättern entsprechen (vergl. E). 48 hpi ist ein leichter Anstieg der H_2O_2 -Produktion zu verzeichnen. **B**, H_2O_2 -Produktion nach *U. hordei* $\Delta pep1$ -Infektion. Es kommt zu einer frühen H_2O_2 -Antwort 24 hpi, deren Intensität innerhalb der nächsten 24 Stunden wieder abnimmt und daraufhin mit der *U. hordei*-Infektion vergleichbar sind. **C**, H_2O_2 -Produktion nach *U. maydis*-Infektion. Während das Niveau der H_2O_2 -Antwort 24 hpi dem der *U. hordei*-Infektion entspricht, kann 48 hpi eine starke Induktion der H_2O_2 -Produktion in der Apoplastenflüssigkeit gezeigt werden, die wesentlich höher ausfällt als die frühe Antwort nach $\Delta pep1$ -Infektion. **D**, H_2O_2 -Produktion nach *U. maydis* $\Delta pep1$ -Infektion. Genau wie nach *U. hordei* $\Delta pep1$ -Infektion kommt es zu einem frühen 'burst' nach 24 Stunden, dessen Intensität 48 hpi auf *U. hordei*-Niveau zurückfällt. **E**, Überlagerung der in A-D wiedergegebenen Graphen, inklusive der Daten für Apoplastenflüssigkeit aus mock-infizierten Blättern. Zur vereinfachten Darstellung wurde auf Fehlerindikatoren verzichtet. Gemessene Intensitäten für Apoplastenflüssigkeit aus mock-infizierten Blättern wurden für jeden Zeitpunkt gleich 1 gesetzt; die angegebenen Fehlerindikatoren zeigen den SEM aus mindestens zwei biologischen Replikaten. Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$

werden, da Fe^{2+} durch Peroxide zu Fe^{3+} oxidiert wird, wodurch es zur Komplexbildung mit XO und dem entsprechenden Farbumschlag kommt. Die Intensität des entstehenden Farbumschlags kann durch dessen Absorption bei 560 nm spektrophotometrisch gemessen werden.

Hierfür wurden 10 Tage alte Gerstenpflanzen mit Sporidiensuspensionen der entsprechenden *Ustilago*-Stämme infiziert und 12, 24 und 48 hpi Apoplastenflüssigkeit der infizierten Blattbereiche isoliert. Die darin enthaltene relative H_2O_2 -Menge wurde daraufhin mit Hilfe des XO-Assays bestimmt. Basierend auf einer einstündigen Kinetik wurde folglich der Anstieg der Absorption ermittelt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu mock-infizierten Blättern in der kompatiblen Interaktion mit *U. hordei* keine H_2O_2 -Antwort zu verzeichnen ist. Lediglich 48 hpi kommt es zu einer leichten H_2O_2 -Akkumulation (Abb. 26 A). Nach Infektion mit *U. hordei* Δpep1 und *U. maydis* Δpep1 kommt es hingegen 24 hpi zu einer frühen H_2O_2 -Antwort deren Intensität mehr als doppelt so hoch ist wie die der mock-Kontrolle. Allerdings nimmt die H_2O_2 -Konzentration in der jeweiligen Apoplastenflüssigkeit wieder ab und zeigt 48 hpi ein mit der *U. hordei*-Infektion vergleichbares Niveau (Abb. 26 B und D). Für die Interaktion mit *U. maydis* konnte ein exakt gegensätzliches Profil beobachtet werden. Hier ist die H_2O_2 -Antwort nach 12 und 24 hpi mit der *U. hordei*-Infektion und der mock-Kontrolle vergleichbar. In den folgenden Stunden kommt es jedoch zu einer massiven Anreicherung von H_2O_2 in der Apoplastenflüssigkeit, deren Intensität die des frühen ‚burst‘ nach Δpep1 -Infektionen weit übersteigt (Abb. 26 C).

3 Diskussion

Zum besseren Verständnis der Infektionsstrategie von *U. hordei*, sowie der detaillierten pflanzlichen Abwehrmechanismen während einer Infektion, hat sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung grundlegender Aspekte von Kompatibilität und Inkompatibilität im *Ustilago*/Gerste-Pathosystem beschäftigt. Hierbei lag der Fokus nicht allein auf der kompatiblen Interaktion von Gerste und *U. hordei*, sondern ebenfalls auf der Nicht-Wirt-Resistenz gegenüber dem Maispathogen *Ustilago maydis*, sowie den inkompatiblen Interaktionen mit den *pep1*-Effektordelentionsmutanten von *U. hordei* und *U. maydis*.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass *U. hordei* als vollständig adaptiertes Pathogen seine Wirtspflanze fast symptomfrei infizieren kann, da pflanzliche Immunreaktionen supprimiert werden, während es nach Infektion mit den inkompatiblen Effektormutanten und dem Nicht-Wirt-Pathogen zu programmiertem Zelltod kommt. Dieser basiert in Abhängigkeit des infizierenden Pathogens auf der Aktivierung unterschiedlicher Zelltod-Mechanismen, welche gleichermaßen die Resistenz der Gerstenpflanze vermitteln.

3.1 *U. hordei* etabliert eine biotrophe Interaktion mit Gerste

Dass *U. hordei* Gerste symptomfrei infiziert, wurde bereits mehrfach beschrieben und bestätigt (Hu et al., 2002; Hu et al., 2003; Linning et al., 2004; Grewal et al., 2008; Gaudet et al., 2010; Laurie et al., 2012). Hierfür wurde jeweils, in Anlehnung an eine Freilandinfektion, die Koleoptile des Gerstenkeimlings mit Pilzsporen infiziert. Demnach wurde der Infektionsprozess für Blattinfektionen noch nicht beschrieben und es war unklar, ob die *U. hordei*-Infektion den gleichen Mustern folgt. Zwar hatten sich Blattinfektionen zuvor bereits ebenfalls erfolgreich gezeigt (Doehlemann et al., 2009), eine detaillierte Charakterisierung der frühen Infektionsphase lag jedoch noch nicht vor. Daher wurde eine mikroskopische Analyse der ersten sechs Infektionstage mit Hilfe diverser Färbungen durchgeführt bei der gezeigt werden konnte, dass *U. hordei* auch im Blattgewebe nach erfolgreicher Penetration eine biotrophe Interaktion etabliert und pflanzliche Abwehrreaktionen primär ausbleiben. Zudem erfolgt ein gerichtetes Wachstum der Hyphen in und entlang der Leitbündel, während eine Proliferation im Mesophyllgewebe des Blattes größtenteils ausbleibt. Interessanterweise konnte ab 4 dpi eine morphologische Oberflächenvergrößerung Leitbündel-assoziiierter Hyphen beobachtet werden. Dies könnte mit der Nährstoffversorgung des Pilzes zusammenhängen. Während viele phytopathogene Pilze, wie beispielsweise dikaryotische Rost- oder echte Mehltaupilze, spezielle Strukturen zur Nährstoffaufnahme ausbilden, fehlen solche sogenannten Haustorien bei den *Ustilaginales*. Da eine Blattinfektion bei *U. hordei* unter natürlichen Gegebenheiten

nicht vorkommt, ist der Pilz möglicherweise mit Nährstoff-limitierenden Bedingungen konfrontiert. Neben der an Haustorien erinnernden Morphologie der Oberflächenvergrößerungen (vergl. Abb. 10) haben *Microarray*-Experimente während der frühen Infektionsphase von *U. hordei* gezeigt, dass mit der Besiedelung des Gewebes eine Reihe von Transportproteinen transkriptionell induziert wird. Hierbei handelt es sich insbesondere um Kohlenstoff- und Stickstofftransporter deren Expression teilweise bis zu 20-fach, oder im Falle eines Ammonium-Transporters sogar mehr als 100-fach, induziert ist (Mathow, 2011). Unter den induzierten Zuckertransportern findet sich auch das *U. hordei*-Ortholog (*UH_03988*) des *U. maydis* Saccharose-Transporters *Srt1* (*um02374*), dessen hohe Substrataffinität die effiziente Aufnahme von apoplastischer Saccharose vermittelt und als Virulenzfaktor beschrieben werden konnte (Wahl et al., 2010). Die transkriptionelle Induktion der diversen Transportproteine, sowie die Ballon-artigen Oberflächenvergrößerungen, insbesondere der Hyphenspitzen, legen demnach eine Haustorien-ähnliche Funktion nahe, um die Nährstoffversorgung des Pilzes in den Leitbündelgeweben sicherzustellen. Interessanterweise konnten diese Haustorien-ähnlichen Strukturen nicht bei Hyphen identifiziert werden, die innerhalb des Mesophyllgewebes wuchsen. Gleichzeitig wurden 5-6 dpi vereinzelt Autofluoreszenzsignale im Mesophyllgewebe beobachtet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich *U. hordei* hier nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgen kann und Hyphenareale absterben. Diese könnten wiederum als Elizitoren zur Aktivierung des pflanzlichen Immunsystems führen, wodurch es zu lokalen Abwehrreaktionen kommt.

Trotz der ‚artificialen‘ Infektionsmethode zeigen sich die Blattinfektionen erfolgreich, da in ca. 15% der hervortretenden Ähren Sporen differenziert werden (nicht gezeigt). Hier können jedoch keine vergleichenden Schlüsse über die Effizienz der Sporenbildung getroffen werden, da ähnliche Studien nach Koleoptilen-Infektion fehlen. Entgegen der durch Hu et al., (2002) getroffenen Aussage, dass *U. hordei* nicht in der Lage sei Gerstenpflanzen auch in späteren als dem Koleoptilen-Stadium erfolgreich infizieren zu können, zeigt diese Arbeit, dass Blattinfektionen ebenfalls zur erfolgreichen Infektion durch *U. hordei* führen und eine gute Basis zur Untersuchung pathogenitäts-relevanter Fragestellungen bilden.

3.2 *U. hordei* unterdrückt aktiv pflanzliche Abwehrreaktionen

Eine erfolgreiche Infektion setzt voraus, dass pflanzliche Abwehrreaktionen, insbesondere programmierter Zelltod, vermieden werden. Dies ist in der biotrophen Interaktion von *U. hordei* und Gerste der Fall. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen aktiven Prozess seitens des Pilzes handelt, da PAMP-induzierter Zelltod im

Blattgewebe unterdrückt werden kann. Hier wäre alternativ denkbar gewesen, dass *U. hordei* Abwehrreaktionen nicht unterdrückt, sondern sich erfolgreich maskiert, sodass diese nicht ausgelöst werden. Dies könnte ähnlich ablaufen wie bei *C. fulvum*, wo die beiden sekretierten Effektoren Avr4 und Ecp6 durch Bindung an Chitin eine PAMP-Perzeption verhindern (van den Burg et al., 2004; de Jonge und Thomma, 2009; de Jonge et al., 2010). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch im *M. oryzae*/Reis-Pathosystem gezeigt (Mentlak et al., 2012). Natürlich ist nicht ausgeschlossen, dass ein vergleichbarer Mechanismus auch an einer *U. hordei*-Infektion beteiligt ist. Für ein sekretiertes LysM-Protein aus *U. maydis* (Um11464) konnte jedoch bislang keine direkte Bindung an Chitin bestätigt werden (Nancy Stolle; pers. Mitteilung). Ein entsprechendes *U. hordei*-Ortholog (UH_03469) zeigt zu allen getesteten Zeitpunkten eine mindestens 2-fache, transkriptionelle Induktion (Mathow, 2011).

Die aktive Suppression pflanzlicher Immunreaktionen durch *U. hordei* impliziert jedoch, dass sekretierten Effektoren, neben einer möglichen Maskierung, an der Manipulation des pflanzlichen Abwehrsystems beteiligt sind. Bislang konnte jedoch einzig das konservierte Effektorprotein Pep1 charakterisiert und als essentieller Virulenzfaktor beschrieben werden (Doehlemann et al., 2009; Hemetsberger et al., 2012). Für einen erfolgreichen Infektionsprozess ist jedoch die Aktivität einer Vielzahl von Effektoren nötig.

Zur detaillierteren Analyse der während einer Infektion ablaufenden Prozesse, wurden *Microarray*-basierte Transkriptomanalysen durchgeführt, welche Einblicke in die molekularen Abläufe während der kompatiblen *U. hordei*/Gerste-Interaktion (20 hpi, 40 hpi, 3 dpi, 6 dpi), sowie der inkompatiblen Interaktion von Gerste mit der *pep1*-Deletionsmutante und der inkompatiblen Nicht-Wirt-Interaktion von *U. hordei* mit Mais geben konnten (Mathow, 2011; D. Mathow und G. Döhlemann, pers. Mitteilung). Anhand der erhaltenen Expressionsprofile wurden 18 Kandidatengene für Deletionsstudien ausgewählt um deren potentielle Rolle während der Virulenz von *U. hordei* zu untersuchen. Da die Etablierung einer biotrophen Interaktion die Suppression von Abwehrreaktionen voraussetzt, müssen Effektoren die mit dem Immunsystem interferieren zum Zeitpunkt der Penetration aktiviert und sekretiert werden. Daher war ein Hauptkriterium zur Auswahl der Kandidatengene die starke Induktion während der beiden frühen Zeitpunkte (20 hpi; 40 hpi). Hier erwartet man somit hauptsächlich Virulenzfaktoren, welche die Abwehr unterdrücken um eine biotrophe Interaktion zu ermöglichen. Durch die im Verlauf der Infektion induzierten Transportproteine konnte gezeigt werden, dass neben der Aufrechterhaltung der Biotrophie auch der Nährstoffversorgung eine bedeutende Rolle zukommt. Eine stark induzierte Genexpression in den beiden späteren Zeitpunkten war somit ebenfalls ein Kriterium zur Selektion der Kandidatengene. Eine dritte Gruppe an Genen wurde ausgewählt aufgrund der, im Vergleich zur kompatiblen Interaktion, stark veränderten Gen-

expression während der inkompatiblen Interaktionen. So finden sich unter den 18 Kandidaten beispielsweise 7 Gene deren Expression bei einer Infektion mit $\Delta pep1$ jeweils komplett ausgeschaltet ist und somit in direktem Zusammenhang mit Pep1 stehen. Neben diesen Kriterien wurde zudem darauf geachtet, ob eine potentielle Funktion vorausgesagt werden konnte oder ob die jeweiligen Gene ein Ortholog in *U. maydis* aufweisen. Zusätzlich wurde das zu *U. maydis pit2* orthologe *U. hordei*-Gen (*UH_02064*) ausgewählt, da für das Effektorprotein Pit2 eine Rolle als Protease-Inhibitor gezeigt werden konnte und es als essentieller Virulenzfaktor fungiert (Doehlemann et al., 2011; Mueller et al., 2013).

Fünf der 30 verifizierten Deletionsmutanten wiesen trotz korrekter Ergebnisse in der PCR-basierten Analyse eine Expression des Kandidatengens auf. Dabei erreicht die Genexpression von ΔUH_03322_2 und ΔUH_14478_1-3 jeweils etwa 50% der regulären Expression (Abb. 13). Dies liegt möglicherweise daran, dass es sich bei einem der beiden Kreuzungspartner zwar um eine Deletionsmutante handelt, der andere Kreuzungspartner womöglich aber weiterhin eine funktionelle Version des Kandidatengens trägt.

Deletionsstudien in *U. maydis* konnten zeigen, dass Infektionen mit *knock out*-Mutanten der Gene *um01820* (Ortholog zu *UH_02700*) und *um03201* (Ortholog zu *UH_04984*) keinerlei Veränderung des Phänotyps hervorrufen, während die Deletion der potenziellen Pseudouridin-Synthase *c* in *U. maydis* (*um03924*; Ortholog zu *UH_05948*) eine reduzierte Oberflächenhydrophobizität des Pilzes verursacht. Über eine mögliche Auswirkung auf die Pilzbesiedelung der entsprechenden *U. hordei*-Deletionsmutanten kann jedoch bislang keine Aussage getroffen werden. Die Deletion des *U. maydis* Gens *um03274* zeigt hingegen einen fast apathogenen Virulenzphänotyp. In diesem Zusammenhang zeigt auch die Pflanzeninfektion der ΔUH_05101 -Mutanten eine starke Reduktion der Pilzbesiedelung im infizierten Blattgewebe. Zwar fehlen weitere biologische Replikate, das vorläufige Ergebnis zeigt jedoch im direkten Vergleich zur Wildtyp-Infektion eine ähnlich starke Reduktion (ΔUH_05101_1 : 27%; ΔUH_05101_2 : 23%; ΔUH_05101_3 : 11%) wie die apathogene *pep1*-Deletionsmutante (15%). Dass diese trotz ihres Pathogenitätsdefekts immernoch 15% relative Pilzbesiedelung im Vergleich zur Wildtyp-Infektion zeigt, ist möglicherweise auf die Analysemethode zurückzuführen. Ein Großteil der applizierten Sporiden verbleibt auf der Blattoberfläche ohne infektiöse Strukturen auszubilden. Daher werden die Blätter mit 1% Tween20 abgewaschen um dieses Pilzmaterial zu entfernen. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weiterhin ein gewisses Maß der für die Quantifizierung analysierten Pilz-DNA von der Blattoberfläche stammt. Dennoch eignet sich diese Methode zur ersten Untersuchung eines potentiellen Besiedelungsdefekts, muss jedoch durch weitere Ansätze, wie beispielsweise einer detaillierten mikroskopischen Analyse, ergänzt werden.

Zusätzlich konnte eine Reduktion der Pilzbesiedelung bislang für vier weitere Deletionsmutanten gezeigt werden (ΔUH_04865 , ΔUH_08049 , ΔUH_16458 und $\Delta pit2$), die alle zwischen 25% und 50% weniger Pilz-DNA im Blattgewebe aufwiesen als eine Infektion mit der Wildtyp-Kreuzung. Orthologe für UH_08049 und UH_16458 fehlen in *U. maydis* und *um03105* als Ortholog zu UH_04865 wurde bislang nicht deletiert, weshalb hier kein Vergleich angestellt werden kann. Eindeutige Parallelen sind aber zwischen *U. hordei* $\Delta pit2$ und *U. maydis* $\Delta pit2$ erkennbar. Für *U. maydis* $\Delta pit2$ konnte beschrieben werden, dass die Mutante normal penetrieren kann und auch 2 dpi eine mit dem Wildtyp vergleichbare Proliferation zeigt. Allerdings konnte 8 dpi keine deutliche Zunahme der Pilzbesiedelung beobachtet werden (Doehlemann et al., 2011). Demnach zeigt sich bei *U. maydis* $\Delta pit2$, genau wie bei *U. hordei* $\Delta pit2$ (50%) eine reduzierte Pilzbesiedelung im Blattgewebe. Bei Pit2 (*U. maydis*) handelt es sich um einen Inhibitor mehrerer apoplastischer Cysteinproteasen, wodurch der Effektor in die SA-abhängige Immunabwehr eingreift. Die inhibitorische Funktion geht hierbei auf ein 14 Aminosäure langes Sequenzmotif, die PID14 (*protease inhibitor domain*), zurück, deren Deletion zum fast vollständigen Verlust der Virulenz und dem für $\Delta pit2$ charakteristischen Phänotyp führt (Mueller et al., 2013). Diese spezifische PID14 ist neben *U. hordei* Pit2 auch in Orthologen anderer verwandter Brandpilze konserviert. Daher ist anzunehmen, dass *U. hordei* Pit2 und *U. maydis* Pit2 gleiche oder ähnliche Aufgaben erfüllen.

Ein vielversprechender Kandidat mit potentieller Virulenz-relevanter Funktion war auch die sekretierte Metalloprotease UH_07510 . Diese weist große Ähnlichkeit zur Mep1 Metalloprotease von *Coccidioides posadasii* auf. Dieser humanpathogene Ascomycet verursacht die als Talfieber bekannte Kokzidioidomykose, bei deren Infektionsverlauf Mep1 eine zentrale Pathogenitäts-relevante Rolle spielt. Die sekretierte Metalloprotease sorgt für den Abbau des Oberflächenantigens SOWgp, wodurch die pilzlichen Endosporen nicht vom Immunsystem detektiert werden können (Hung et al., 2005). Allerdings hat die Deletion von UH_07510 keinen Einfluss auf die Blattbesiedelung durch *U. hordei*. Daher ist eine Virulenz-relevante Funktion dieses Effektors unwahrscheinlich. Bei AVR-Pita, einem Avirulenzprotein des Reisbranderregers *Magnaporthe oryzae* handelt es sich ebenfalls um eine Metalloprotease (Jia et al., 2000), die auf DNA-Basis eine 32%ige Sequenzidentität mit UH_07510 aufweist. Daher ist nicht auszuschließen, dass UH_07510 einen Avirulenzfaktor von *U. hordei* darstellt. Im entsprechenden Gerstenkultivar würde bei Infektion der Deletionsmutante folglich keine Erkennung durch das korrespondierende R-Protein stattfinden. Anhand der Pilzbesiedelung kann jedoch nicht auf eine Virulenz-relevante Funktion geschlossen werden.

Außerdem sind für *U. hordei*-Effektoren diverse weitere Funktionen denkbar, um mit dem pflanzlichen Immunsystem zu interferieren. Als Orientierungspunkte dienen hier bereits beschriebene Effektoren anderer phytopathogener Mikroorganismen. Für *P. syringae* konnte gezeigt werden, dass sekretierte Effektorproteine beispielsweise als Cysteinproteasen (AvrRpt2, HopN1 und AvrPphB) (Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003; Shao et al., 2003; Kim et al., 2005; DeYoung et al., 2012; Rodriguez-Herva et al., 2012), als Proteinphosphatase (HopPtoD2) (Bretz et al., 2003) oder als Phosphothreonin-Lyase (HopAI1) (Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2012) agieren. Ebenfalls denkbar wäre eine Art TAL-Effektoren wie in Xanthomonaden oder das Eingreifen in die pflanzliche Exocytose, ähnlich der Funktion des *P. infestans*-Effektors AVRblb2, sodass eine Anreicherung apoplastischer Abwehrkomponenten ausbleibt. Zudem gibt es diverse Punkte der intrazellulären Signalweiterleitung, an denen Abwehrreaktionen erfolgreich supprimiert werden können. Nicht zuletzt ist die direkte Suppression von programmiertem Zelltod denkbar, was ebenfalls bereits mehrfach gezeigt werden konnte. Neben der Funktion von *P. syringae* AvrPtoB als E3-Ubiquitinligase, die den spezifischen Abbau der Zelltod-induzierenden Kinase Fen vermittelt (Abramovitch et al., 2003; Jamir et al., 2003; de Torres et al., 2006), ist beispielsweise auch der cytoplasmatische *P. infestans* Effektor Avr3a in der Lage PCD zu unterdrücken indem er das pflanzliche Ubiquitin/Proteasom-System manipuliert (Armstrong et al., 2005; Vleeshouwers et al., 2006; González-Lamothe et al., 2006; Bos et al., 2006; Bos et al., 2009). Das Ausbleiben einer Zelltodantwort nach *U. hordei*-Infektion deutet jedenfalls auf effiziente Zelltodsuppressoren hin.

3.3 *U. maydis* und *pep1*-Deletionsmutanten sind inkompatible Gersten-Pathogene

Kompatibilität erfordert ein komplexes Zusammenspiel von Effektoren die der Unterdrückung der Pflanzenabwehr dienen und Effektoren die das metabolische Umprogrammieren der Wirtspflanze vermitteln. Bereits einzelne Effektoren können jedoch über Erfolg oder Misserfolg einer Interaktion entscheiden. So führt beispielsweise die Erkennung eines Avr-Proteins durch ein R-Protein zur erfolgreichen Resistenz der Wirtspflanze. Genauso kann die Deletion eines einzelnen Effektors über Kompatibilität oder Inkompatibilität entscheiden. Dies ist bei $\Delta pep1$ der Fall. Während einer Wildtyp-Infektion fungiert Pep1 als Inhibitor apoplastischer Peroxidasen, sodass deren Aktivität und damit die Deposition von Callose und der ‚oxidative burst‘ im Rahmen der Immunantwort unterdrückt werden. Die Deletion des Effektors führt hingegen zur erfolgreichen Aktivierung der Abwehrmaschinerie und es kommt zur Papillenbildung an der Penetrationsstelle, sowie einer lokalen H₂O₂-Antwort die in programmiertem Zelltod der attackierten Zelle resultiert.

Die Interaktion mit $\Delta pep1$ -Mutanten ist daher inkompatibel, was sowohl für das *U. hordeii* Gerste-Pathosystem, als auch für das *U. maydis*/Mais-Pathosystem gültig ist.

Inkompatibilität besteht auch in einer sogenannte Nicht-Wirt-Interaktion (NHI; *non-host interaction*). Hierbei trifft ein Pathogen auf eine Wirtspflanze, für die es nicht ausreichend adaptiert ist. Ein Grund hierfür kann sein, dass die Effektoren nicht in der Lage sind das Immunsystem der Pflanze zu unterdrücken, wodurch es zu einer Zelltodantwort kommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *U. hordeii* eine normale biotrophe Interaktion mit Gerste etabliert, während *U. maydis* eine typische Nicht-Wirt-Resistenz (NHR; *non-host resistance*) induziert. Die *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante verhält sich hingegen genauso wie die *U. hordeii* $\Delta pep1$ -Mutante. Damit beruhen die durch *U. maydis* $\Delta pep1$ induzierten Abwehrreaktionen interessanterweise auf der Effektordelation und nicht auf der Tatsache, dass es sich um ein Nicht-Wirt-Pathogen handelt. Es besteht also folglich ein grundlegender Unterschied zwischen der inkompatiblen Interaktion mit $\Delta pep1$ -Mutanten und der inkompatiblen Interaktion mit *U. maydis*. Während Appressorienbildung und Penetrationseffizienz keinen Unterschied zeigen, lässt sich dieser Tatbestand bereits durch die Viabilität infizierter Zellen zeigen, welche nach *U. maydis*-Infektion signifikant geringer ist als nach $\Delta pep1$ -Infektionen. Gleichzeitig konnte dies auch anhand der makroskopischen Infektionssymptome gezeigt werden, da eine Infektion mit $\Delta pep1$ -Mutanten, ähnlich einer *U. hordeii*-Infektion, lediglich in lokalen chlorotischen Läsionen resultiert. Eine *U. maydis*-Infektion führt dagegen zu flächendeckenden Chlorosen und starken nekrotischen Läsionen. Teilweise ist ein ‚*runaway cell death*‘ zu beobachten, der nach $\Delta pep1$ -Infektion nicht auftritt. Dies korreliert auch mit der Wachstumsretardation der Gerstenpflanzen, die aufgrund des biotischen Stresses durch die Pilzinfektion resultiert. Um die Überlebensrate unter Stressbedingungen zu maximieren, kommt es durch Umverteilung von Energie und Rohstoffen zwischen verschiedenen physiologischen Prozessen zu einer Reduktion des pflanzlichen Metabolismus, der zur beobachteten Verlangsamung des Wachstums führt (Bohnert et al., 1995; Heil und Baldwin, 2002; Burdon und Thrall, 2003). Andererseits sorgt aber auch der Verlust von Nährstoffen an das Pathogen zur Einschränkung des Metabolismus in betroffenen Arealen. Daher zeigt auch die kompatible Interaktion mit *U. hordeii* verkürzte Blattlängen im Vergleich zu mock-infizierten Kontrollpflanzen, die ähnlich stark ausgeprägt sind wie bei $\Delta pep1$ -infizierten Pflanzen. Den größten Effekt zeigen jedoch auch hier *U. maydis*-infizierte Pflanzen.

Durch Infektion von *BI-1* überexprimierenden Pflanzen konnte schließlich verdeutlicht werden, dass sich die Inkompatibilität bei *U. maydis* von der Inkompatibilität nach $\Delta pep1$ -Infektion anhand der induzierten Zelltodmechanismen unterscheidet, da die *BI-1* Über-

expression einen positiven Einfluss auf *U. maydis*-Infektionen nimmt, während Infektionen mit den $\Delta pep1$ -Mutanten ohne Effekt bleiben.

Die Penetrationseffizienz durch *U. maydis* war bei BI-1 ÜE-Pflanzen mehr als doppelt so hoch wie in Kontrollpflanzen und auch epidermale H_2O_2 -Bildung und Zelltod-Induktion waren stark reduziert. Ein vergleichbares Phänomen konnte bei Infektionen mit Gerstenmehltau beobachtet werden. In *mlo*-resistenten Gerstenpflanzen reagiert das Immunsystem mit effektiver Papillenbildung auf Penetrationsversuche von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*), sodass der Pilz am Eindringen in das Pflanzengewebe gehindert wird. Die Überexpression von *BI-1* in *mlo*-Pflanzen vermittelt auch hier eine signifikante Steigerung der Penetrationseffizienz von *Bgh* von etwa 5% auf ca. 20% (Hückelhoven et al., 2003; Eichmann, 2005; Eichmann et al., 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *BI-1* gleichzeitig auch die Abwehr-spezifische H_2O_2 -Antwort verringert, da in signifikant weniger attackierten Zellen eine Akkumulation von H_2O_2 detektiert werden konnte (Eichmann, 2005). Gleiches gilt ebenfalls für die NHI von Gerste mit dem Erreger des Weizenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*) (Eichmann et al., 2004; Eichmann, 2005; Eichmann et al., 2006). Allerdings beschränkt sich die Unterdrückung der NHR durch BI-1 offenbar auf die epidermale Immunantwort, da *U. maydis*-Hyphen im Mesophyllgewebe erkannt werden und dort Zelltod auslösen. Auch dieser Befund deckt sich mit den Beobachtungen bei Gersteninfektionen mit *Bgt*.

3.4 Nicht-Wirt-Resistenz resultiert aus Apoptose-ähnlichem Zelltod

Da BI-1 Teil der apoptotischen, bzw. einer Apoptose-ähnlichen Zelltod-Maschinerie ist (siehe auch Abb. 4) (Xu und Reed, 1998; Hückelhoven et al., 2004; Watanabe und Lam, 2009; Ishikawa et al., 2011), muss es sich demnach bei Zelltod im Rahmen der NHI um einen Apoptose-ähnlichen Mechanismus handeln. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde ein enzymatischer Caspase-Aktivitätstest mit Proteinextrakten infizierter Blätter durchgeführt, da Caspase-Aktivität eines der charakteristischen Merkmale apoptotischen Zelltods ist. Allerdings wurden bislang, trotz der vollständigen Sequenzierung diverser Genome, keine Caspase-Homologe in Pflanzen identifiziert. Jedoch wurden zwei Gruppen Caspase-ähnlicher Proteasen (CLPs; *caspase-like proteases*) beschrieben, für die Caspase-ähnliche Funktionen gezeigt werden konnten: Cystein-Endopeptidasen und Serin-Endopeptidasen (Rojo et al., 2004; Coffeen und Wolpert, 2004). Die Cystein-Endopeptidasen umfassen Metacaspasen und ‚*vacuolar processing enzymes*‘ (VPEs), die sich in ihren proteolytischen Eigenschaften unterscheiden (Xu und Zhang, 2009; Bozhkov et al., 2010). Zwar weisen Metacaspasen eine vergleichbare Domänenstruktur zu Caspasen auf (Uren et al., 2000) und ihre Aktivität kann durch Caspase-spezifische

Inhibitorpeptide supprimiert werden, sie sind aber nicht Aspartat-spezifisch, sondern spalten nach Arginin oder Lysin (Piszczek und Gutman, 2007; Enoksson und Salvesen, 2010). VPEs und Caspasen zeigen hingegen eine vergleichbare Spezifität, wobei VPEs zusätzlich C-terminal von Asparagin spalten können (Hatsugai et al., 2004; Hara-Nishimura et al., 2005). Allerdings lokalisieren alle vier bislang bekannten VPEs in der pflanzlichen Vakuole und nicht wie Caspasen im Cytoplasma (Hara-Nishimura, 2005; Piszczek und Gutman, 2007). In Hafer bzw. Tabak und Reis konnten zudem zwei Gruppen von Serin-Endopeptidasen mit Caspase-ähnlicher Substratspezifität beschrieben werden, Saspasen und Phytaspasen (Coffeen und Wolpert, 2004; Chichkova et al., 2010; Vartapetian et al., 2011). Demnach wurde auch Caspase-ähnliche Enzymaktivität, wie die hier untersuchte DEVDase-Aktivität, bereits mehrfach beschrieben (del Pozo und Lam, 1998; Zhang et al., 2009; Fernández et al., 2012; Han et al., 2012; Rodríguez-Serrano et al., 2012). Mit Hilfe eines selektiven Substrats (Ac-DEVD-MCA), spezifisch für die Effektor-Caspase-3 (siehe auch Abb. 4) konnte gezeigt werden, dass 30 hpi einzig bei Extrakten *U. maydis*-infizierter Blätter ein signifikanter Anstieg der Substratspaltung zu verzeichnen war, der auf eine erhöhte Caspase-ähnliche Aktivität schließen lässt. Diese konnte ebenfalls spezifisch durch ein korrespondierendes Inhibitor-Peptid blockiert werden. Demnach kommt es nach Infektion eines Nicht-Wirt-Pathogens zur spezifischen Aktivierung von CLPs die im Rahmen eines Apoptose-ähnlichen Zelltod-Mechanismus Substrat-spezifische Spaltung von Zielpeptiden vermitteln.

Zu den morphologischen Charakteristika von Apoptose gehören unter anderem die Kondensierung des Chromatins, das Schrumpfen der Zelle, DNA-, ‚*laddering*‘, ‚*membrane blebbing*‘ und das Entstehen apoptotischer Körperchen (Vaux und Strasser, 1996; Hengartner, 2000; Potten und Wilson, 2004). Einige dieser Merkmale finden sich ebenfalls bei PCD in Pflanzen, wie beispielsweise Chromatinkondensierung, Zellkernfragmentierung und das Schrumpfen der Zelle (Wang et al., 1996; Maraschin et al., 2005), welche jedoch nicht für die *U. maydis*/Gerste-Interaktion nachgewiesen werden konnten. TEM-Aufnahmen konnten aber zusätzliche Aspekte von apoptotischem Zelltod aufzeigen. So war in einem späten Infektionsstadium eine Art Blasenbildung der Cytoplasmamembran zu verzeichnen, die morphologisch an das ‚*membrane blebbing*‘ erinnert. Zudem kam es zur frühen Ruptur der Tonoplastmembran, wodurch die hydrolytischen Enzyme der Vakuole ins Cytoplasma freigegeben werden und dort den Abbau des Zellinhalts vermitteln. Hierfür spricht auch, dass in der ‚späten‘ Zelle neben der außergewöhnlichen Morphologie der Cytoplasmamembran, nahezu kein Zellinhalt mehr erkennbar war (vergl. Abb. 24 E-G). Zusätzlich konnten CeCl_3 -Präzipitate im Cytoplasma, in Mitochondrien und der Zellwand nachgewiesen werden, was auf oxidativen Stress hindeutet. Auch hier lassen sich Parallelen zur Apoptose aufzeigen, da es beim intrinsischen Signalweg durch

die Porenbildung der äußeren Mitochondrienmembran und der darauf resultierenden Entlassung diverser pro-apoptotischer Faktoren ins Cytoplasma zur gleichzeitigen Inhibition der Atmungskette kommt, wodurch die Akkumulation von ROS verstärkt wird, es zu größerem oxidativen Stress kommt und somit eine positive Rückkopplung zur Amplifikation des apoptotischen Signals entsteht (Kroemer et al., 2007). Der Nachweis von H₂O₂ in Mitochondrien und dem Cytoplasma ist demnach ein weiterer Hinweis auf apoptotischen Zelltod, da die funktionelle Störung der Mitochondrien und die Freigabe von Cytochrom c ins Cytoplasma auch bei Stress-vermitteltem Zelltod in Pflanzen beschrieben wurde (Reape et al., 2008; Reape und McCabe, 2008). Die Infektion von Gerste mit *U. maydis* führt demnach zu epidermalem, Apoptose-ähnlichem Zelltod.

3.5 Autophagie geht einher mit $\Delta pep1$ -Infektionen

Ein BI-1-unabhängiger Zelltod-Mechanismus wird durch Autophagie beschrieben. Zwar handelt es sich hierbei hauptsächlich um einen Prozess zum kontrollierten Abbau von Zellbestandteilen, spielt aber auch eine große Rolle bei Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen (Liu et al., 2005; Seay et al., 2006; Hofius et al., 2009; Hofius et al., 2011). Jedoch konnte bislang noch nicht eindeutig determiniert werden, ob Autophagie im Rahmen der Pflanzenabwehr eine ‚*pro-survival*‘- oder eine ‚*pro-death*‘-Funktion einnimmt. Klar ist jedoch, dass PCD oftmals viele morphologische Charakteristika von Autophagie aufweist (Bassham, 2007; Hofius et al., 2011). Hierzu gehören in erster Linie die typischen Autophagosomen, welche mittels mikroskopischer Techniken nachgewiesen werden können (Klionsky et al., 2008).

So konnten sowohl MDC-Färbungen, als auch TEM-Aufnahmen die Anwesenheit von Autophagosomen nach Infektion mit der *U. hordei* und *U. maydis* $\Delta pep1$ -Mutante bestätigen, während weder in *U. hordei*-, noch in *U. maydis*-infizierten Zellen Hinweise für Autophagie detektierbar waren. Die Quantifizierung penetrierter Zellen mit angefärbten autophagischen Vesikeln hat zudem ergeben, dass nach Infektion mit den Wildtyp-Stämmen von *U. hordei* und *U. maydis* jeweils nur eine geringe Anzahl der Zellen (5,5-7,5%) Autophagosomen aufzeigen. Dies entspricht möglicherweise der basalen Aktivität zur Remobilisierung von Nährstoffen. Dementgegen steht die signifikante Induktion von Autophagie in jeweils mehr als 80% der durch $\Delta pep1$ -attackierten Zellen. Ein ähnliches Resultat konnte für das *U. maydis*/Mais-Pathosystem beschrieben werden. Hier interagiert der konservierte Bereich des Effektorproteins Tin3 mit dem Autophagie-Protein Beclin1, wodurch es zur Unterdrückung von Autophagie kommt. Wildtyp-infizierte Pflanzen zeigen daher lediglich eine basale Induktion von etwa 7%. Hingegen führen Infektionen mit der Effektordeletionsmutante zur Induktion von Autophagie in 72% der Fälle (Neidig, 2013).

Dass trotz des eindeutigen mikroskopischen Nachweises von Autophagosomen keine transkriptionelle Induktion der getesteten ATG-Gene in $\Delta pep1$ -infizierten Blattbereichen nachzuweisen war, liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an einem sehr starken Verdünnungseffekt. Bedenkt man, dass nur ca. 13% der ausgebildeten Appressorien in einer Penetration enden, wird deutlich, dass überhaupt nur sehr wenige Zellen infiziert sind. Setzt man diese Zellen in ein Verhältnis mit Zellen des Blattgewebes in denen keine Autophagie stattfindet, so ist der Anteil an Autophagie-positiven Zellen sehr gering. Daher besteht die Möglichkeit, dass Markergene zwar effizient induziert werden, jedoch nicht detektiert werden können. Ein Lösungsansatz bietet hier die Infektion der Koleoptile, da das Schutzorgan neben oberer und unterer Epidermis lediglich aus einer limitierten Anzahl Mesophyllzellen besteht. Bei einer gleichen Infektionsrate würde demnach ein wesentlich günstigeres Verhältnis zwischen infizierten und nicht-infizierten erzielt und der Verdünnungseffekt könnte dadurch minimiert werden. Gleiches gilt für die Expression der getesteten Callose-Synthase.

Neben der Frage nach der ‚*pro-survival*‘- oder der ‚*pro-death*‘-Funktion konnte zudem bislang noch nicht ausreichend aufgeklärt werden, ob Autophagie aktiv oder passiv an programmiertem Zelltod beteiligt ist. Daher sind mehrere Szenarien denkbar um Autophagie mit PCD als Folge von Pathogenattacken zu verknüpfen.

Liu et al. (2005) konnten die zellschützende Funktion von Autophagie durch die Eingrenzung HR-induzierten Zelltods beschreiben. Hierbei kommt es zum Autophagie-vermittelten Abbau von H_2O_2 -toxifizierten Zellen, bzw. Zellbestandteilen wodurch ein Ausbreiten des Zelltod-induzierenden Signals verhindert wird. In diesem Fall hätte Autophagie eine ‚*pro-survival*‘-Funktion. Es ist also durchaus denkbar, dass Autophagie im Rahmen einer $\Delta pep1$ -Infektion ebenfalls dazu dient die Zelltodreaktion einzugrenzen. Hierfür spricht, dass es im Gegensatz zur NHI nur zu einer lokalen Zelltodantwort kommt, obwohl die Akkumulation von H_2O_2 als Antwort auf $\Delta pep1$ -Infektion gezeigt werden konnte (Doehlemann et al., 2009). Hierbei handelt es sich jedoch um eine extrazelluläre Akkumulation. Aus diversen Krebszellstudien ist bekannt, dass durch extrazelluläre ROS Autophagie induziert wird (Li et al., 2012). Indizien hierfür gibt es auch bei Pflanzen, da beispielsweise die ektopische Zugabe von ROS Autophagie in Tabakpflanzen induziert (Hayward und Dinesh-Kumar, 2011). Daher besteht ebenso die Möglichkeit, dass der apoplastische ‚*oxidative burst*‘ nach $\Delta pep1$ -Infektion auslösender Stimulus der beschriebenen Autophagie ist. Durch Hofius et al. (2009) wurde eine ‚*pro-death*‘-Funktion von Autophagie beschrieben, da das genetische Ausschalten verschiedener ATG-Gene in *A. thaliana* zur Suppression von HR-induziertem Zelltod als Antwort auf eine Avr/R-Interaktion führte. In diesem Beispiel ist Autophagie somit der ausführende Mechanismus

der zum gezielten Eliminieren der attackierten Zelle führt. Allerdings scheint es sich beim $\Delta pep1$ -Phänotyp nicht um HR-induzierten Zelltod zu handeln, zumal der frühe Zeitpunkt der Abwehrinduktion ebenfalls gegen dieses Szenario spricht. Des Weiteren gilt Xenophagie als Teil des funktionellen Immunsystems in tierischen Zellen (Levine und Deretic, 2007). Hierbei dient Autophagy dem gezielten Abbau intrazellulärer Pathogene. Dies ist allerdings im Fall einer *Ustilago*-Infektion nicht möglich. Dennoch wäre denkbar, dass in einem ähnlichen Prozess nicht das Pathogen selbst, sondern dessen cytoplasmatische Effektoren zielgerichtet aus der betroffenen Zelle entfernt werden, wodurch die Suppression des Immunsystems ausbleiben würde. Autophagie wäre folglich jedoch nur eine Begleiterscheinung des induzierten Zelltods. Zwar besteht die Möglichkeit, dass ein solcher Mechanismus als Teil der pflanzlichen Immunantwort fungiert, erklärt jedoch nicht die signifikante Induktion von Autophagie nach $\Delta pep1$ -Infektion. Genauso müssten demnach Autophagosomen in jeder penetrierten Zelle nachweisbar sein, was zumindest in *U. hordei*- und *U. maydis*-infizierten Zellen nicht der Fall ist. Jedoch lässt sich diese Hypothese mit einem weiteren Szenario verbinden, nämlich der aktiven Effektor-vermittelten Suppression von Autophagie als Teil der basalen Immunabwehr. In tierischen Systemen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass sogenannte Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs; *Toll-like receptors*) durch die Induktion spezifischer Signalwege an der direkten Kontrolle des Autophagie-Mechanismus beteiligt sind (Xu et al., 2007; Lee et al., 2007; Sanjuan et al., 2007; Delgado et al., 2008; Delgado und Deretic, 2009). TLRs beschreiben eine Gruppe von PRR-Membranrezeptoren und spielen daher eine zentrale Rolle bei der unspezifischen Erkennung von Pathogenen und der damit verbundenen Induktion der Immunabwehr (Delgado und Deretic, 2009). Demnach wird die Autophagie-Maschinerie einer PAMP-Perzeption folgend induziert und muss mittels spezieller Effektoren inhibiert werden, wodurch es sich hier ebenfalls um eine ‚pro-death‘-Funktion handelt. Ein Beispiel hierfür ist der IcsB-Effektor von *Shigella flexneri*, dem medizinisch-relevanten Erreger der Bakterienruhr. IcsB interferiert hier mit der direkten Interaktion des Autophagie-Proteins Atg5 und dem *Shigella*-Oberflächenprotein VirG, wodurch eine Induktion von Autophagie ausbleibt. *IcsB*-Mutanten werden hingegen vom Immunsystem erkannt und per Xenophagie eliminiert (Ogawa et al., 2005). Hinweise darauf, dass ein vergleichbarer Prozess in Pflanzen vorliegt, konnte mittels *Microarray*-basierten Transkriptomanalysen im Rahmen der AtGenExpress Initiative (www.arabidopsis.org) gezeigt werden. Hier wurden *A. thaliana*-Pflanzen mit verschiedenen PAMPs stimuliert und auf die transkriptionelle Induktion Autophagie-relevanter Gene untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der pflanzlichen Immunabwehr in der Induktion von 40% aller in *A. thaliana* bekannten ATG-Gene resultiert (Lenz, 2011). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass *A. thaliana atg*-Mutanten

eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Alternaria brassicicola* zeigen, da es durch Autophagie nicht mehr zur Eindämmung der HSTs kommt und eine Infektion daher in ‚*runaway cell death*‘ resultiert. In der gleichen Studie konnte Autophagie zudem eine Rolle bei der Kontrolle der SA-Homöostase zugeschrieben werden, sodass es durch erhöhte Mengen des Phytohormons in *atg*-Mutanten zur verstärkten Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen kommt (Lenz et al., 2011). Demnach führt PAMP-Perzeption auch in Pflanzen zur Aktivierung der Autophagie-Maschinerie und ist Teil der basalen Immunabwehr. Dies wurde auch in *Sclerotinia sclerotiorum* gezeigt. Der nekrotrophe Pilz sekretiert das nicht-spezifische Phytotoxin Oxalsäure (OA; *oxalic acid*), wodurch es zur Induktion von sich verbreitendem Apoptose-ähnlichem Zelltod kommt (Kim et al., 2008; Williams et al., 2011). OA-Mutanten die nicht in der Lage sind OA zu produzieren haben einen apathogenen Phänotyp und führen zu einem lokalen ‚*oxidative burst*‘, verbunden mit Callose Deposition und der Induktion von phenolischen Substanzen, Reaktionen die normalerweise durch OA supprimiert werden (Williams et al., 2011). Mittels mikroskopischer, chemischer und revers-genetischer Ansätze konnte nun gezeigt werden, dass der aus diesen Abwehrreaktionen resultierende lokale Zelltod Autophagie-vermittelt ist und ein initiales Ausbreiten des Pilzes im Gewebe verhindert, sodass dieser nicht in der Lage ist sein nekrotrophes Wachstumsprogramm zu starten (Kabbage et al., 2013).

Dass der konservierte Bereich des *U. maydis* Effektors Tin3 mit Beclin-1 interagiert und Infektionen mit der $\Delta tin3$ -Mutante zur Ausbildung von Autophagosomen in infizierten Zellen führen (Neidig, 2013) spricht zudem dafür, dass Autophagie als Abwehrreaktion durch Effektorproteine unterdrückt werden muss und kann.

Für Pep1 wurde bislang keine Interaktion mit Komponenten der Autophagie-Maschinerie gezeigt, da der Effektor aber direkt mit einer apoplastischen Peroxidase zur Suppression des ‚*oxidative burst*‘ interagiert, ist eine zusätzliche Inhibitor von Autophagie eher unwahrscheinlich. Der Autophagie-Phänotyp nach $\Delta pep1$ -Infektion lässt sich demnach für dieses Szenario nur mit der Tatsache erklären, dass in den *Microarray*-basierten Transkriptomanalysen diverse Effektoren identifiziert werden konnten, deren Induktion bei einer $\Delta pep1$ -Infektion ausbleibt (Mathow, 2011). Somit könnte es sein, dass die Deletion von *pep1* zum gleichzeitigen Verlust der transkriptionellen Induktion eines oder mehrerer Effektorproteine führt, deren Aufgabe in der Suppression von Autophagie liegt.

Allerdings gibt dieses Szenario keinen Anhaltspunkt darüber, ob Autophagie in diesem Fall die ausführende Rolle bei der Eliminierung der Zelle übernimmt, oder nur einen sekundären Effekt des programmierten Zelltods darstellt um möglicherweise wiederverwertbare Zellbestandteile zu ‚recyclen‘. Zur Untersuchung einer solchen Fragestellung haben Shen und Codogno (2011) drei Kriterien vorgeschlagen, welche zur

Definition von ‚*autophagic cell death*‘ erfüllt sein sollten: (i) der Zelltod erfolgt unabhängig von Apoptose, bzw. Apoptose-ähnlichem Zelltod; (ii) es kommt zu einer erhöhten Abbaukinetik in der betroffenen Zelle und nicht nur zu Anreicherung autophagischer Vesikel (welche nicht degradiert werden); (iii) die Suppression von Autophagie mittels genetischer Ansätze oder chemischer Inhibitoren verhindert den programmierten Zelltod. Nur wenn alle drei dieser Kriterien erfüllt sind kann man folglich von Autophagie-vermitteltem Zelltod sprechen.

3.6 Inkompatibilität gegenüber $\Delta pep1$ -Mutanten bzw. *U. maydis* beruht auf PAMP- bzw. Effektor-vermittelter Immunität

Die Akkumulation von PR-Proteinen und die Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere von H_2O_2 , zählen zu den zentralen und wichtigsten Komponenten der pflanzlichen Immunabwehr. Eine Infektion geht folglich mit der Induktion von *PR*-Genen und der Produktion von Wasserstoffperoxid einher, Mechanismen die in einer kompatiblen Interaktion inhibiert werden können, während sie bei Inkompatibilität in vollem Ausmaß zum Tragen kommen.

Beide Prozesse basieren auf der Akkumulation von Phytohormonen, vornehmlich jedoch Salizylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA), welche sowohl an der PAMP-vermittelten, als auch an der Effektor-vermittelten Immunität beteiligt sind und daher Schlüsselfaktoren der Abwehrregulation darstellen (Koornneef et al., 2008; Vlot et al., 2009). So führt die Induktion der SA-Synthese, verbunden mit der SA-abhängigen Signaltransduktion, zur Aktivierung verschiedener WRKY-Transkriptionsfaktoren, der Expression diverser *PR*-Gene, sowie der Akkumulation von ROS (Dangl et al., 1996; Morris et al., 1998; Glazebrook, 2005; Vlot et al., 2009; Fernandes et al., 2013).

PR1 dient als etabliertes Markergen für die Induktion SA-abhängiger Abwehrreaktionen, sein Funktionsmechanismus ist jedoch unverstanden (Esfandiari et al., 2005; Seo et al., 2008; van der Linde et al., 2012). Ein weiterer Marker für SA-abhängige Abwehr ist *PR10*, welches Homologien zu Ribonucleasen zeigt (Bufe et al., 1996), jedoch ebenfalls funktionell nicht vollends verstanden ist (Fernandes et al., 2013).

WRKY-Proteine bilden eine Multigenfamilie Pflanzen-spezifischer Transkriptionsfaktoren und besitzen ein charakteristisches Aminosäure-Motiv, die WRKY-Domäne, welches an spezifische DNA-Bereiche mit einer zentralen TTGAC-Sequenz (W-Box) bindet. Einige der WRKY-Proteine sind an Entwicklungsprozessen beteiligt, aber ihre Hauptaufgabe liegt in der Regulation von Reaktionen auf biotische und abiotische Reize (Pandey und Somssich, 2009). In Gerste konnte für *WRKY1* und *WRKY2* eine Rolle als Suszeptibilitätsfaktoren gezeigt werden, da die Überexpression der Transkriptionsfaktoren zur

erhöhten Anfälligkeit durch Gerstenmehltau führt (Leib, 2005). WRKY22 ist hingegen ein bislang nicht charakterisiertes Homolog des *A. thaliana* Transkriptionsfaktors WRKY41. Für *AtWRKY41* konnte gezeigt werden, dass dessen Expression SA-abhängig bei der HR-Reaktion nach Flagellin-Perzeption des Nicht-Wirt-Pathogens *P. syringae* pv. *tabaci* induziert wird. Zusätzlich führt die Überexpression von *AtWRKY41* zur verstärkten Resistenz gegenüber dem kompatiblen Pathogen *P. syringae* pv. *tomato* (Higashi et al., 2008). Alle drei HR-Marker, *PR1*, *PR10* und *WRKY22* sind nach Infektionen mit *U. maydis* stark induziert, insbesondere 48 hpi. Nach $\Delta pep1$ -Infektion wird lediglich nach 24 Stunden eine Induktion dieser Gene beobachtet, dies ist jedoch um ein Vielfaches schwächer als nach *U. maydis*-Infektion. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei der Reaktion gegenüber *U. maydis*-Infektion um eine hypersensitive Antwort handelt, nicht jedoch in der $\Delta pep1$ -Interaktion.

Auch die H_2O_2 -Antwort zeigt große Unterschiede zwischen den inkompatiblen Interaktionen. So konnte mit Hilfe des Xylenolorange-Assays zwar sowohl während der $\Delta pep1$ -Interaktionen, als auch in der *U. maydis*-Interaktion eine Akkumulation von H_2O_2 in der Apoplastenflüssigkeit infizierter Blattbereiche nachgewiesen werden, Zeitpunkt und Intensität der Anreicherung waren jedoch sehr unterschiedlich. Die kompatible *U. hordei*-Interaktion führt im Verlauf der ersten 48 Stunden der Infektion zu einem leichten, kontinuierlichen Anstieg der H_2O_2 -Konzentration in der Apoplastenflüssigkeit, die jedoch keine Besonderheiten zeigt und mit großer Wahrscheinlichkeit auf vereinzelte erfolgreich abgewehrte Penetrationsversuche zurückgeht oder auf der Erkennung von Pilzaggregaten auf der Blattoberfläche beruht. Hingegen kommt es nach Infektion mit den *pep1*-Deletionsmutanten zu einem frühen ‚oxidative burst‘ 24 hpi, dessen Intensität im weiteren Verlauf wieder abnimmt, während eine Infektion mit *U. maydis* in einem später auftretenden und dafür wesentlich intensiveren ‚oxidative burst‘ resultiert. Verbindet man dieses Phänomen mit der schematischen Darstellung zur repräsentativen Kinetik des ‚oxidative burst‘ (Abb. 3), lassen sich deutliche Parallelen erkennen. Demnach könnte man, wenn auch in anderem zeitlichen Maßstab, die beiden Maxima in der H_2O_2 -Anreicherung von $\Delta pep1$ - und *U. maydis*-Infektionen mit den Maxima der Phase I und Phase II des ‚oxidative burst‘ vergleichen. Phase I beschreibt die rapide Induktion von ROS innerhalb weniger Minuten nach PAMP- / MAMP-Perzeption. Da eine *Ustilago*-Infektion nicht synchron abläuft, beschreibt der 24 Stunden Zeitpunkt eine Art Mittel des Zeitfensters in dem die Oberflächenpenetrationen stattfindet und somit die Pflanzenabwehr induziert wird. Demnach verkörpert die frühe H_2O_2 -Antwort nach $\Delta pep1$ -Infektion einen PAMP-vermittelten ‚oxidative burst‘. Bei der Interaktion mit *U. maydis* kann in der Apoplastenflüssigkeit eine im Vergleich zu $\Delta pep1$ -Infektionen spätere, verstärkte Akkumu-

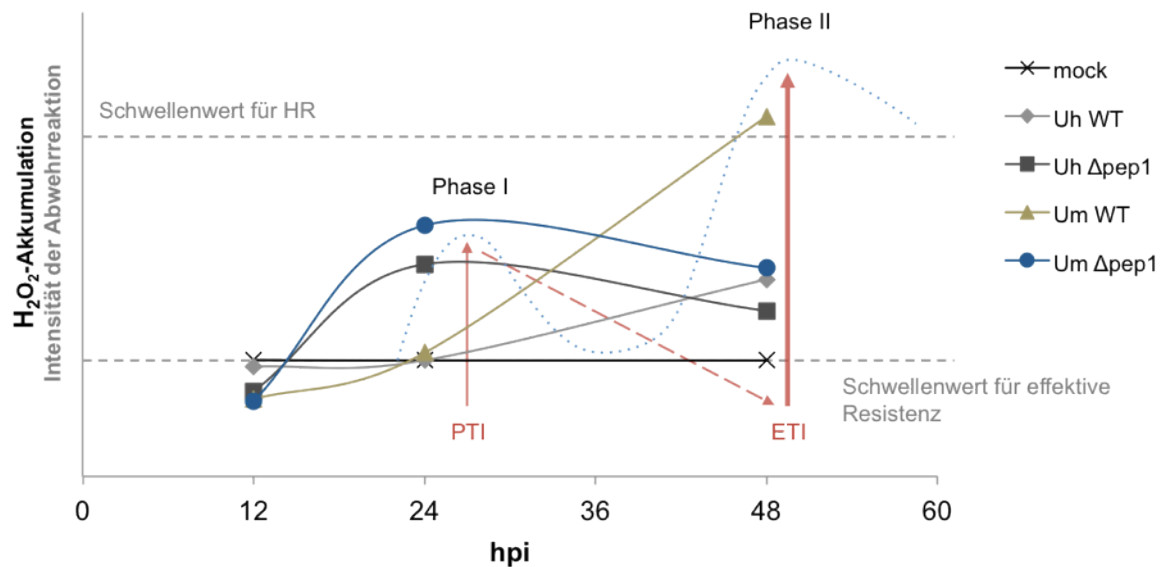


Abb. 27: PTI und ETI als Basis der inkompatiblen Interaktionen mit *pep1*-Deletionsmutanten und dem Nicht-Wirt-Pathogen *U. maydis*. Die gemessenen H_2O_2 -Konzentrationen der *Ustilago/*Gerste-Interaktionen in Vereinbarung mit der Kinetik des ‚oxidative burst‘ (blau gepunktete Linie) und dem quantitativen Modell der pflanzlichen Abwehrreaktionen (rote Pfeile). Details, siehe Text. Y-Achse wurde relativiert. Siehe auch Abb. 2, 3 und 26. Uh WT: *U. hordei*; Uh $\Delta pep1$: *U. hordei* $\Delta pep1$; Um WT: *U. maydis*; Um $\Delta pep1$: *U. maydis* $\Delta pep1$.

lation von H_2O_2 beschrieben werden, die der Phase II des ‚oxidative burst‘ entspricht. Allerdings ist das zeitliche Verhältnis zwischen Phase I und Phase II nicht mit dem von Lamb und Dixon (1997) beschriebenen Modell übereinstimmend. Für das *U. maydis*/Mais-Pathosystem konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass der durch Hitze-inaktivierte *U. maydis*-Zellen hervorgerufene, PAMP-vermittelte ‚oxidative burst‘ in Mais ebenfalls länger andauert (Hemetsberger et al., 2012), wodurch die Zeitachse zu relativieren ist. Der frühe ‚burst‘ kann in der *U. maydis*-Interaktion hingegen erfolgreich unterdrückt werden und es kommt zu keiner Akkumulation von H_2O_2 zum 24 Stunden-Zeitpunkt.

Zusammengenommen implizieren diese Ergebnisse, dass die Inkompatibilität nach Infektion der *pep1*-Deletionsmutanten auf eine PAMP-vermittelte Immunität zurückgeht, während die Inkompatibilität nach *U. maydis* WT-Infektion einer Effektor-vermittelten Immunität entspricht.

3.7 Model zur Zelltod-Induktion im *Ustilago*/Gerste-Pathosystem

Die Etablierung der kompatiblen, biotrophen Interaktion von *U. hordei* und Gerste beruht auf einer Vielfalt von Effektoren die in der Lage sind Abwehrreaktionen des pflanzlichen Immunsystems erfolgreich inhibieren zu können. Zwar kommt es zu Beginn der Interaktion durch PAMP-Perzeption zu einer Induktion der Pflanzenabwehr, sämtliche Reaktionen werden jedoch durch das ‚core effectome‘ unterdrückt. Demnach bleiben die Deposition von Callose, die Akkumulation von H_2O_2 , die Aktivierung von SA-abhängigen

Transkriptionsfaktoren und *PR*-Genen, sowie die Induktion von programmiertem Zelltod aus. Diese Suppression des pflanzlichen Immunsystems wird auch im Verlauf der kompatiblen Interaktion aufrechterhalten und es kommt zur normalen Entwicklung des Pathogens.

Anders verläuft hingegen die Interaktion von Gerste mit den inkompatiblen *pep1*-Deletionsmutanten oder dem Nicht-Wirt-Pathogen *U. maydis*.

Im Fall einer $\Delta pep1$ -Infektion kommt es zu keiner Etablierung der biotrophen Interaktion. Hier induziert die PAMP-Perzeption eine spezifische MAP-Kinase-Kaskade welche die Induktion SA-abhängiger Abwehrreaktionen vermittelt. Gleichzeitig werden apoplastische Klasse-III-Peroxidasen aktiviert, welche die Anreicherung von ROS katalysieren und somit einen apoplastischen ‚oxidative burst‘ initialisieren. Durch das Fehlen des ‚core effectors‘ Pep1 kann dieser Prozess nicht durch die Interaktion mit den Peroxidasen inhibiert werden. Daher kommt es zu einer anhaltenden Akkumulation von apoplastischem Peroxid und zur Induktion der Papillenbildung durch Lignifizierung der Zellwand und Deposition von Callose. Die katalysierten ROS bilden als ‚second messenger‘ eine positive Rückkopplung gegenüber den SA-induzierten Abwehrreaktionen, wodurch es zur Synthese weiterer Peroxidasen kommt. Die extrazelluläre H₂O₂-Akkumulation zeigt zudem toxische Wirkung gegenüber der Pilzhyphe, wobei jedoch auch angrenzende Zellareale in Mitleidenschaft gezogen werden. Für die Induktion der Autophagie sind zwei Mechanismen wahrscheinlich. Zum einen können die extrazellulären ROS als Stimuli zur Aktivierung der Autophagie-Maschinerie agieren. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass unter den Effektoren die im *pep1*-Deletionsstamm nicht mehr induziert werden auch ein ‚core effector‘ mit Autophagie-inhibierender Funktion ist. Aufgrund des fehlenden Inhibitors käme es durch PAMP-Perzeption zur Induktion von Autophagie. Gleichermaßen ist auch denkbar, dass beide Mechanismen an der Induktion beteiligt sind. Letztendlich kommt es zu programmiertem Zelltod der attackierten Zelle. Ob Autophagie in diesem Zusammenhang eine aktive oder passive Rolle spielt, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

Eine Infektion mit *U. maydis* verläuft zu Beginn ähnlich wie eine *U. hordei*-Infektion. Zwar kommt es auch hier durch PAMP-Perzeption zu einer Induktion der Pflanzenabwehr, das Nicht-Wirt-Pathogen verfügt aber über ein vollständiges ‚core effectome‘. Es zeigen sich zwar Unterschiede bei den Effektoren, der Grad der funktionellen Konservierung reicht jedoch aus um die basalen Abwehrmechanismen zu supprimieren. So kann Pep1 mit apoplastischen Peroxidasen interagieren und die apoplastische Akkumulation von H₂O₂ unterdrücken. Die Induktion von Autophagie bleibt aus und eine PAMP-vermittelte Immunität wird verhindert. Allerdings kommt es im weiteren Verlauf der Infektion zur Abwehr des Pathogens. Dies kann beispielsweise durch die Erkennung cytoplasmatischer Effek-

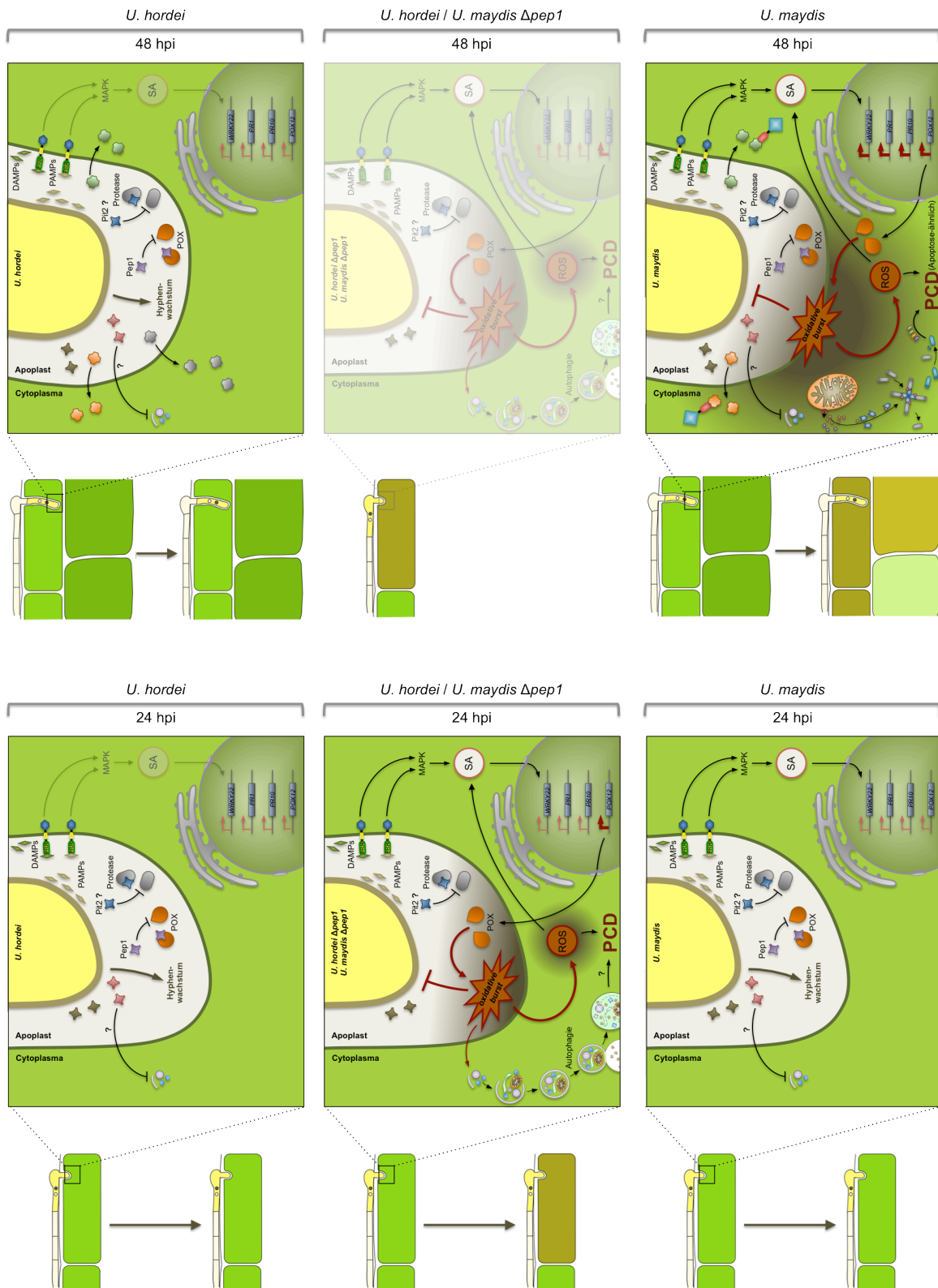


Abb. 28: Modell zu den molekularen und zellulären Abläufen während kompatibler und inkompatibler Interaktionen im *Ustilago*/Gerste-Pathosystem. Das Modell zeigt grundlegende Bedingungen in der kompatiblen Interaktion von Gerste und *U. hordei*, sowie der inkompatiblen Interaktion von Gerste mit *U. maydis*, bzw. den *pep1*-Deletionsmutanten von *U. hordei* und *U. maydis* jeweils 24 und 48 Stunden nach der Infektion. Für Details, siehe Text. DAMPs, *damage-associated molecular patterns*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*; POX, *Peroxidase*; PR, *pathogenesis related*; PRR, *pattern recognition receptor*; SA, *salicylic acid*; ROS, *reactive oxygen species*.

toren, ähnlich einer Avr/R-Interaktion, vermittelt werden. Die Aktivierung von SA und SA-abhängiger Signalwege führt zur Expression Abwehr-assoziiertes *WRKY*- und *PR*-Gene. Gleichzeitig kommt es zur Akkumulation von ROS in der Zelle und es entsteht eine positive Rückkopplung zwischen SA-Akkumulation und ROS-Produktion. Die starke Anreicherung von H₂O₂, eine vermehrte Deposition von Callose und Lignin, sowie die starke Induktion von Abwehr-assoziierten Genen resultiert in einer hypersensitiven Antwort der Zelle. Hierbei kommt es zur Induktion von Mitochondrium-vermitteltem Apoptose-ähnlichem Zelltod. Somit resultiert die Infektion mit *U. maydis* in einer Effektor-vermittelten Immunität.

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass Autophagie als Komponente der basalen Immunabwehr zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion mit einer *pep1*-Deletionsmutante induziert wird und Teil der PAMP-vermittelten Immunität in inkompatiblen Interaktionen ist. Apoptose-ähnlicher Zelltod als Folge einer Nicht-Wirt-Interaktion mit *U. maydis* ist Teil der Effektor-vermittelten Immunität, wird daher erst zu einem späteren Zeitpunkt induziert und geht mit stärkeren Auswirkungen einher.

Dass *U. maydis* $\Delta pep1$ die gleichen Auswirkungen zeigt wie die *U. hordei pep1*-Deletionsmutante obwohl es sich um ein Nicht-Wirt-Pathogen handelt verdeutlicht, dass Autophagie ‚upstream‘ von Apoptose-ähnlichem Zelltod agiert.

3.8 Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit $\Delta pep1$ -Mutanten zur Induktion von Autophagie im Rahmen der Zelltodantwort führt. Unklar bleibt hier jedoch, ob Autophagie in diesem Fall aktiv oder passiv am Tod der betroffenen Zelle beteiligt ist. Im Rahmen der von Shen und Codogno (2011) definierten Kriterien zur Determination von ‚autophagic cell death‘ sollte somit, neben der Abbaukinetik in der betroffenen Zelle, untersucht werden, ob Suppression von Autophagie den programmierten Zelltod verhindert. Hierfür könnten beispielsweise die chemischen Autophagie-Inhibitoren Wortmannin, 3-Methyladenin oder Chloroquin verwendet werden. Gleichzeitig, da das Generieren transgener Autophagie-defizienter Pflanzen sehr zeitaufwändig ist, besteht die Möglichkeit, essentielle Komponenten der Autophagie-Maschinerie mittels Virus-induziertem Gen *silencing* (VIGS) stillzulegen.

Bezüglich der Frage ob Autophagie generell als Teil der basalen, PAMP-induzierten Immunantwort gilt, ist geplant, Gerste mit Chitosan zu infiltrieren und anschließend eine MDC-Färbung durchzuführen, um zu überprüfen, ob die PAMP-Behandlung zur Formation von Autophagosomen führt. Erste Vorversuche wurden hierfür bereits unternommen.

Des Weiteren soll in unserem Labor die Methode der Koleoptilen-Infektion für das *U. hordeii*/Gerste-Pathosystem eingeführt werden. Die Infektion der Koleoptile spart Zeit und Gewächshaus-Kapazität, Hauptgrund ist jedoch, dass aufgrund der limitierten Zellzahl ein verbesserter Nachweis der Genexpression diverser Markergene möglich scheint. Dadurch könnte die zusätzliche Induktion verschiedener Zelltod-spezifischer Gene, sowie genereller Abwehr-assoziiierter Gene überprüft werden.

Im Rahmen der Identifizierung von Effektoren mit Virulenz-relevanter Funktion konnten bislang lediglich vorläufige Ergebnisse hinsichtlich eines Defekts bei der Besiedelung des Blattgewebes erzielt werden. Demnach müssen hier zusätzliche Replikate untersucht werden um stabile Datensätze zu erhalten. Gleichmaßen sollen alle bislang deletierten Kandidatengene ebenfalls mittels Pflanzeninfektion auf einen möglichen Virulenzdefekt untersucht werden. Da diese Methode nur als eine Art basaler ‚screen‘ zur Eingrenzung der verschiedenen Kandidatengene dient, sind bei Kandidaten mit einem verzeichneten Virulenzdefekt weitere mikroskopische Analysen geplant um diesen Effekt zu bestätigen und den Infektionsverlauf detailliert zu beschreiben. Zeigen sich Kandidaten mit einer eindeutigen Virulenz-relevanten Funktion kann für diese eine fundierte Charakterisierung zur Ermittlung der Funktion vorgenommen werden.

Die Möglichkeit, dass der Prozess der Autophagie als Teil der basalen Immunabwehr einer PAMP-Perzeption folgend induziert wird und somit zur erfolgreichen Etablierung einer biotrophen Interaktion unterdrückt werden muss, legt einen besonderen Schwerpunkt auf die Identifizierung eines oder mehrerer Autophagie-Suppressoren. Hier zeigen sich alle sekretierten Effektoren deren Gene die im Zusammenhang mit einer *U. hordei* $\Delta pep1$ -Interaktion mit Gerste nicht transkriptionell reguliert werden als interessante und mögliche Kandidaten. Hier könnte man beispielsweise neben den klassischen Deletionsstudien einen Hefe-basierten Ansatz wählen, bei dem in Hefezellen unter induzierbaren Bedingungen die Autophagie-Maschinerie aktiviert werden kann. Eine gleichzeitige Expression der einzelnen Kandidatengene würde zeigen, ob diese in der Lage sind die induzierte Autophagie zu inhibieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

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

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.

4.1.3 Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M.) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA- Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn), KOD Xtreme™ Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt), Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) sowie die Taq-Polymerase enthaltende RedMix (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mit der T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim) durchgeführt. Für den enzymatischen Abbau von RNA wurde RNase A (Serva, Heidelberg) verwendet. Enzymatischer Abbau von Zellwänden erfolgte mit Lysozym (Roche, Mannheim) und Novozym 234 (Novo Nordisc; Kopenhagen, Dänemark).

4.1.4 Verwendete Kits und sonstige Materialien

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten, sowie zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das ‚Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System‘ von Promega (Mannheim) verwendet. Die Aufreinigung von Plasmiden wurde mit dem ‚QIAprep® Mini Plasmid Kit‘ von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Das ‚TOPO® TA Cloning Kit‘ von

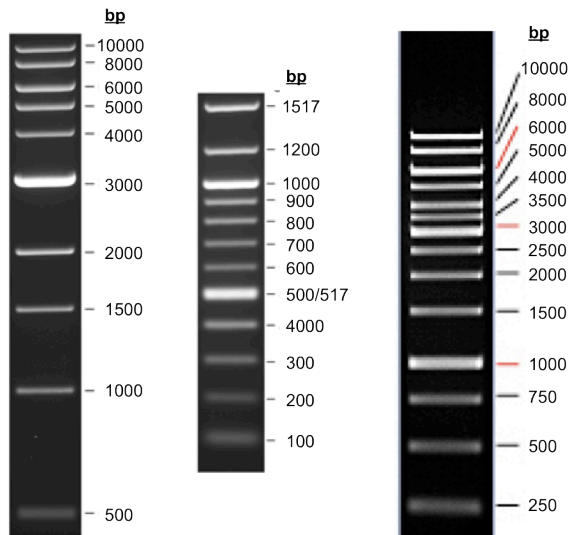


Abb. 29: DNA-Größenstandards. In dieser Arbeit verwendete DNA-Größenstandards. '1 kb ladder' (links; NEB), '100 bp ladder' (mitte; NEB) und 'GeneRuler 1 kb DNA ladder' (rechts; Fermentas).

Invitrogen (Karlsruhe) wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Spezielle Kits sind unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

Als Größenstandards zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden die Marker '1 kb ladder' und '100 bp ladder' von NEB (Frankfurt a.M.), sowie der 'GeneRuler 1 kb DNA ladder' der Firma Fermentas/Thermo Scientific (Bonn) verwendet (Abb. 29).

Weitere verwendete Materialien ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

4.2 Zellkultivierung

4.2.1 *Escherichia coli*

E. coli Stämme wurden in dYT-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte entsprechend der nachstehend angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur hergestellt und bei -80°C gelagert.

<u>Antibiotikum:</u>	<u>Stammlösung:</u>	<u>Endkonzentration:</u>
Ampicillin (Amp)	10 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	10 mg/ml	50 µg/ml
<u>dYT-Flüssigmedium</u> (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 ₂ O, autoklaviert	
<u>YT- Festmedium</u>	0,8 % (w/v) Trypton-Pepton 0,5 % (w/v) Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl 1,3 % (w/v) Agar in dH ₂ O, autoklaviert	

4.2.2 *Ustilago hordei* und *Ustilago maydis*

In dieser Arbeit verwendete *U. hordei*- und *U. maydis*-Kulturen wurden standardmäßig in YEPS_{light}-Flüssigmedium bei 200 Upm inkubiert. Für Festmedien wurden Potato-Dextrose-Agarplatten, ggf. mit Hygromycin (Hyg; 200 µg/ml) verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. hordei*- und *U. maydis*-Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50% NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen Kultur. Filamentationstests wurden auf PD-Charcoal-Platten durchgeführt (vergl. 4.4.4). Die Inkubation von *U. hordei*-Kulturen erfolgte bei 22°C, die Inkubation von *U. maydis*-Kulturen bei 28°C.

<u>YEPS_{light}</u> (modifiziert nach Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	1% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton 1% (w/v) Saccharose in dH ₂ O, autoklaviert
<u>Potato-Dextrose-Agar (PD)</u>	2,4% (w/v) Potato-Dextrose Broth 2% (w/v) Bactoagar in dH ₂ O, autoklaviert
<u>NSY-Glycerin</u>	0,8% (w/v) Nutrient Broth 0,1% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) Saccharose 69,6% (v/v) Glycerin in dH ₂ O, autoklaviert
<u>PD-Vollmedium</u>	2,4% (w/v) Potato-Dextrose Broth 2,0% (w/v) Bactoagar in dH ₂ O, autoklaviert
<u>PD-Charcoal</u>	wie PD-Vollmedium, jedoch zusätzlich 1,0% (w/v) Aktivkohle

4.2.4 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem „Novaspec II“-Gerät (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600 nm (OD_{600nm}) bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die OD_{600nm} des entsprechenden Kulturmediums verwendet. Eine OD_{600nm} von 1 entspricht bei *U. hordei* etwa einer Zellzahl von 3-6 x 10⁷ Zellen, bei *U. maydis* etwa einer Zellzahl von 1-5 x 10⁷ Zellen. Bei *E. coli* entspricht selbiger Wert etwa 1 x 10⁹ Bakterienzellen.

4.3 Stämme, Oligonukleotide und Vektoren

4.3.1 *E. coli*-Stämme

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz/Bezug
K-12 Top10 [F- <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</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>]	Plasmidamplifizierung/ Klonierung	Grant <i>et al.</i> , (1990)/ Invitrogen (Karlsruhe)
K-12 DH5α [F- Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ- <i>thi-lgyr</i> A96 <i>relA1</i>]	Plasmidamplifizierung/ Klonierung	Hanahan (1983)/ Gibco/BRL (Eggenstein)

4.3.2 *U. maydis*-Stämme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete *U. maydis*-Stämme

Name	Genotyp	Gendeletion	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>			Banuet und Herskowitz, (1989)
FB2	<i>a2 b2</i>			Banuet und Herskowitz, (1989)
FB1 Δ <i>pep1</i>	<i>a1 b1</i> Δ <i>um-pep1::hph</i>	<i>um01987</i>	Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , (2009)
FB2 Δ <i>pep1</i>	<i>a2 b2</i> Δ <i>um-pep1::hph</i>	<i>um01987</i>	Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> , (2009)

4.3.3 *U. hordei*-Stämme

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

Name	Genotyp	Gendeletion	Resistenz	Referenz
Uh4857-4	<i>a1b1</i>			Linning <i>et al.</i> (2004)
Uh4857-5	<i>a2b2</i>			Linning <i>et al.</i> (2004)
Uh4857-4 Δ <i>pep1</i>	<i>a1b1</i> Δ <i>uh-pep1::hph</i>	<i>UH_02965</i>	Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> (2009)
8A Δ <i>pep1</i>	<i>a2b2</i> Δ <i>uh-pep1::hph</i>	<i>UH_02965</i>	Hyg	Doehlemann <i>et al.</i> (2009)

Tabelle 5: In dieser Arbeit generierte *U. hordei*-Stämme

Name	Genotyp	Gendeletion	Resistenz	Ausgangsstamm
Uh4857-4_ Δ <i>UH_02064</i>	<i>a1b1</i> Δ <i>UH_02064::hph</i>	<i>UH_02064</i> (<i>pit2</i>)	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ Δ <i>UH_02064</i>	<i>a2b2</i> Δ <i>UH_02064::hph</i>	<i>UH_02064</i> (<i>pit2</i>)	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ Δ <i>UH_00127</i>	<i>a1b1</i> Δ <i>UH_00127::hph</i>	<i>UH_00127</i>	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ Δ <i>UH_00127</i>	<i>a2b2</i> Δ <i>UH_00127::hph</i>	<i>UH_00127</i>	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ Δ <i>UH_02413</i>	<i>a1b1</i> Δ <i>UH_02413::hph</i>	<i>UH_02413</i>	Hyg	Uh4857-4

Uh4857-5_ ΔUH_02413	a2b2 ΔUH_02413::hph	UH_02413	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_02700	a1b1 ΔUH_02700::hph	UH_02700	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_02700	a2b2 ΔUH_02700::hph	UH_02700	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_02811	a1b1 ΔUH_02811::hph	UH_02811	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_02811	a2b2 ΔUH_02811::hph	UH_02811	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_03203	a1b1 ΔUH_03203::hph	UH_03203	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_03203	a2b2 ΔUH_03203::hph	UH_03203	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_03322	a1b1 ΔUH_03322::hph	UH_03322	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_03322	a2b2 ΔUH_03322::hph	UH_03322	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_03756	a1b1 ΔUH_03756::hph	UH_03756	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_03756	a2b2 ΔUH_03756::hph	UH_03756	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_04865	a1b1 ΔUH_04865::hph	UH_04865	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_04865	a2b2 ΔUH_04865::hph	UH_04865	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_04984	a1b1 ΔUH_04984::hph	UH_04984	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_04984	a2b2 ΔUH_04984::hph	UH_04984	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_05101	a1b1 ΔUH_05101::hph	UH_05101	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_05101	a2b2 ΔUH_05101::hph	UH_05101	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_05270	a1b1 ΔUH_05270::hph	UH_05270	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_05270	a2b2 ΔUH_05270::hph	UH_05270	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_05948	a1b1 ΔUH_05948::hph	UH_05948	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_05948	a2b2 ΔUH_05948::hph	UH_05948	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_07510	a1b1 ΔUH_07510::hph	UH_07510	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_07510	a2b2 ΔUH_07510::hph	UH_07510	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_08049	a1b1 ΔUH_08049::hph	UH_08049	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_08049	a2b2 ΔUH_08049::hph	UH_08049	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_13384	a1b1 ΔUH_13384::hph	UH_13384	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ ΔUH_13384	a2b2 ΔUH_13384::hph	UH_13384	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ ΔUH_14478	a1b1 ΔUH_14478::hph	UH_14478	Hyg	Uh4857-4

Uh4857-5_ Δ UH_14478	a2b2 Δ UH_14478::hph	UH_14478	Hyg	Uh4857-5
Uh4857-4_ Δ UH_16458	a1b1 Δ UH_16458::hph	UH_16458	Hyg	Uh4857-4
Uh4857-5_ Δ UH_16458	a2b2 Δ UH_16458::hph	UH_16458	Hyg	Uh4857-5

Zur Gendeletion in *U. hordei* wurde das jeweilige Kandidatengen mittels homologer Rekombination durch einen Hygromycin-Selektionsmarker ersetzt (Abb. 30). Die Verifizierung erfolgte durch eine PCR-basierte Analyse (vergl. Abb. 30). Zusätzlich erfolgt eine Überprüfung der transkriptionellen Geninduktion während der Pflanzeninfektion.

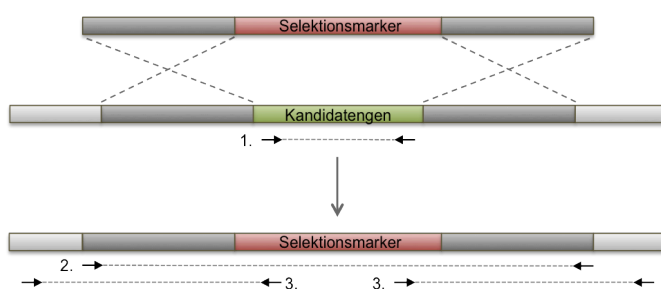


Abb. 30: Schematische Darstellung zur Konstruktion der Deletionsmutanten. Durch homologe Rekombination der angrenzenden DNA-Abschnitte wird das Kandidatengen durch den Selektionsmarker ersetzt. Die Verifizierung der Deletion erfolgt anschließend mittels der angegebenen drei PCR-Reaktionen. Schwarze Pfeile markieren die Positionen der PCR-Primer.

4.3.5 Oligonukleotide

In der Tabelle 6 werden alle in dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Oligonukleotide aufgeführt. Diese wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide¹

laufende Nummer	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' > 3')	Verwendungszweck
Olex 83	Hygro2fwd	CGTGCTTTCAGCTCGATGTAGG	Test auf Transgenität bei BI-1 OE Pflanzen
Olex 84	Hygro1rev	AAGATGTTGGCGACTCGTATTG	Test auf Transgenität bei BI-1 OE Pflanzen
Olex 93	HygR-KpnI-fw	CAATACGGGGTACCTGGCCGAA CGTGGTAACTAC	Amplifizieren der Hyg-Kassette mit flankierender <i>KpnI</i> -Schnittstelle
Olex 94	HygR-KpnI-rv	CGGGGTACCATGTTTGACAGCTT ATCATCGG	Amplifizieren der Hyg-Kassette mit flankierender <i>KpnI</i> -Schnittstelle
Olex 96	uh02064_LB_fw	GTCCGTTGTCCCACGATCGGACT GCCG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt Δ UH_02064
Olex 97	uh02064_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGTCCGTGTA TAGTATGTCGACGAGC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt Δ UH_02064 mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 98	uh02064_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCCGGTTTCA ACTGCTTGATCCCTTTC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt Δ UH_02064 mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 99	uh02064_RB_rv	GCACATGCGAGACAACCATCTC GAGTCCTGG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt Δ UH_02064
Olex 100	uh02064_LB_nest	CAATACGGATGCCGAGGGACTA CCTG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts Δ UH_02064

Olex 101	uh02064_RB_nest	CAACCCTTCGGGATGAAGAAAGA ACCTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02064}
Olex 102	uh02064_RB_seq_r	CCAGACCTGGTTGCTGCTCTTTC C	sequenzieren der 3'-Flanke nach Deletion von UH_{02064} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{02065} liegt
Olex 103	uh16458_LB_fw	CACTTATCGGGAGGTATCAGTCA CAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{16458}
Olex 104	uh16458_LB_rv	GGCCATCTAGGCCTTCGACTGA GTGAGACTGAGAC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{16458} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 105	uh16458_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGGTTTCGTC TTGATTTCTGTC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{16458} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 106	uh16458_RB_rv	GTAAGCTTTCGTCGTCGCCTTTC GTCG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{16458}
Olex 107	uh16458_LB_nest	CATAAGGAAAGGACACAGTGGTA GCTCG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{16458}
Olex 108	uh16458_RB_nest	GGCTCTCGTGCTTTGCCTCTCAT GC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{16458}
Olex 109	uh08049_LB_fw	GGATCGAGATCAAGGAGAGCTA TC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08049}
Olex 110	uh08049_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGTTGACAGC AGCTGAAGTACTCTC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08049} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 111	uh08049_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCAAGGACTAT TGTGGTGAGGAGTG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08049} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 112	uh08049_RB_rv	CCGGTCCTACTTGATGAGCTTAA TGG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08049}
Olex 113	uh08049_LB_nest	CGTTCACCTTTGGTCGCTGTTGA C	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{08049}
Olex 114	uh08049_RB_nest	GAACAGGGCTGTGCATAGCTTA GC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{08049}
Olex 115	uh04865_LB_fw	CACTGATCGCCAGTCATCGGAAC C	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04865}
Olex 116	uh04865_LB_rv	GGCCATCTAGGCCCTCGATCTGT TTAGAAGGTTTAGAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04865} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 117	uh04865_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCTACAGGGCG AGAATGAGGCTCTTGTTG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04865} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 118	uh04865_RB_rv	CTTACCTTCTTCTCCCGCTTGG TG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04865}
Olex 119	uh04865_LB_nest	GTTACCACCGCACGTGTGCAA C	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{04865}
Olex 120	uh04865_RB_nest	CCAGTCGCACTACACGAGATGG AACG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{04865}
Olex 121	uh04865_RB_seq_r	GCAGATGCTGGTGTAGCGTGCT TTCTC	sequenzieren der 3'-Flanke nach Deletion von UH_{04865} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{04866} liegt
Olex 122	uh07510_LB_fw	GGTAGTCAAGTTGAGCTCGGAAC CAC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{07510}
Olex 123	uh07510_LB_rv	GGCCATCTAGGCCTTGCTATAT TCAAGAGGGGAGAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{07510} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 124	uh07510_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGATGGTACA TACAAAAGAAGCAAGC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{07510} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle

Olex 125	uh07510_RB_rv	CTGATTCAAGCCTCCGTTGCAATG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{07510}
Olex 126	uh07510_LB_nest	GCAATCCAAGCACCGGCAATCCTTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{07510}
Olex 127	uh07510_RB_nest	CTTGGTGGTTCGACAAACAAGCCACG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{07510}
Olex 128	uh03322_LB_fw	CGACAAGGAGTCAAGCCTATCAAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03322}
Olex 129	uh03322_LB_rv	GGCCATCTAGGCCTCTACAGATGAAGAGGGGAAAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03322} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 130	uh03322_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGCTGCGCTGATATTCTGTTGAAAGTC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03322} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 131	uh03322_RB_rv	CCATCCTTGCCGTAGATTTCCCGTATTCCC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03322}
Olex 132	uh03322_LB_nest	GGAAACCGGAAGAGTTGATTAGTAGTACG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{03322}
Olex 133	uh03322_RB_nest	CCCTCGGCTTAATCTCTGCTTTACC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{03322}
Olex 134	uh03322_LB_seq_f	CGATTACACCGCTCGATCTGGGTAGG	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{03322} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{03321} liegt
Olex 135	uh03322_RB_seq_r	GATCAATGTTCTCGTCCGTCGCAACCC	sequenzieren der 3'-Flanke nach Deletion von UH_{03322} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{03323} liegt
Olex 136	uh14478_LB_fw	GTCTTGATTTCGAGTGACGGCCACCTG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{14478}
Olex 137	uh14478_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGACCTGCAGAAATACCCTGAAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{14478} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 138	uh14478_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCCTTGACAAGCTAAAGACGAGAAAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{14478} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 139	uh14478_RB_rv	CAGTATCACGCCATCCGTCTCCTCTG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{14478}
Olex 140	uh14478_LB_nest	CATCACGCTTCGACTTGGTAACAATC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{14478}
Olex 141	uh14478_RB_nest	GGTGTGCCATTCTATGCGTTGAG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{14478}
Olex 142	uh14478_LB_seq_f	GCCGTTCAAGGACGTTCAGAAGCTC	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{14478} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{05692} liegt
Olex 143	uh14478_RB_seq_r	CCCTTCTGCCAGGATCACCTATG	sequenzieren der 3'-Flanke nach Deletion von UH_{14478} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{11479} liegt
Olex 144	uh05101_LB_fw	GGATAGCCGCAGGACTATACGATATG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05101}
Olex 145	uh05101_LB_rv	GGCCATCTAGGCCAGTGAATGTGTGTTGGGAGGAAAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05101} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 146	uh05101_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGTGGACTTTACGTCTCTGCTTGTTCC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05101} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 147	uh05101_RB_rv	CGCCAGACAACAGGGTCAAAGTGTG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05101}
Olex 148	uh05101_LB_nest	GCCGATTAGCAGCTTGCCTGGTTG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{05101}

Olex 149	uh05101_RB_nest	GCCTACCCACCAATTCTTCCATA GTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{05101}
Olex 150	uh08819_LB_fw	CCATCCAGCCAGAGGGATTCCGA CCATTG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08819}
Olex 151	uh08819_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGAGATAGCA GTTCACTGAAGGGGAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08819} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 152	uh08819_RBkpn_fw	CTAGGGTACCTTGATCGTGCTAC TGAAAGGATAGGAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08819} mit flankierender <i>KpnI</i> -Schnittstelle
Olex 153	uh08819_RB_rv	CTGCAACTAGGCGCATTCCGATC TCG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{08819}
Olex 154	uh08819_LB_nest	GTGGTCCAGGTGGGAGTGCTTT C	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{08819}
Olex 155	uh08819_RB_nest	CGCCACTCACTTGCCCTCATCTCA CCTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{08819}
Olex 156	uh08819_LB_seq_r	CCTTCAACGACCCAATCGATCTC TTC	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{08819} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{08818} liegt
Olex 157	uh04984_LB_fw	CGCACGGTGAAGGCAACGAAGT ACTG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04984}
Olex 158	uh04984_LB_rv	GGCCATCTAGGCCCTCTCGAGCG CATCCCTAGATCGTCTTTC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04984} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 159	uh04984_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGCGCAATC CTAAGAGAAGCCGGTTTG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04984} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 160	uh04984_RB_rv	CTGAACGGAGTGTTACAGTGGT TAGTC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{04984}
Olex 161	uh04984_LB_nest	GCTCGTTGGGACGCCAAGTTAG GCTTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{04984}
Olex 162	uh04984_RB_nest	CTTTCACGTTTCTGGTGCGGAC CGCTG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{04984}
Olex 163	uh04984_LB_seq_f	CTCGATCCTGTTCTGGCCTCTGC TTG	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{04984} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{04983} liegt
Olex 164	uh02413_LB_fw	GACGTTGGGTGTGAAGCTGCCA ATC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02413}
Olex 165	uh02413_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGGTTGCTTG AGTTGTTGTGCGAGCGTTG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02413} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 166	uh02413_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGATGATGGC TGAGGTCATGTTTGATG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02413} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 167	uh02413_RB_rv	CATCCCAAGCCCACTTGACAGAC CTCG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02413}
Olex 168	uh02413_LB_nest	CACGAGCAATCCAACGCCAGCA TCAAAG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02413}
Olex 169	uh02413_RB_nest	GCGAACCAACAGGGTCAGCTCC AAC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02413}
Olex 175	uh13384_LB_fw	GAGCTGCAACGTATATCTCATCC CACCAAC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{13384}
Olex 176	uh13384_LB_rv	GGCCATCTAGGCCAGAATCATC GTCGATACAGTCTAATG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{13384} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle
Olex 177	uh13384_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGATGAAGGA AAAGCTACTG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{13384} mit flankierender <i>SfiI</i> -Schnittstelle

Olex 178	uh13384_RB_rv	CTTCGCAACCACCAAGCTACGTC TG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{13384}
Olex 183	uh02700_LB_fw	CACGGTGATGATAGTGGCGTAG GC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02700}
Olex 184	uh02700_LB_rv	GGCCATCTAGGCCTTGACAGAA GAATTTGTAAGGTGGG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02700} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 185	uh02700_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCGCTTCTCGT AGCATTCCCTGTAATG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02700} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 186	uh02700_RB_rv	GAAGGCAGGCATGGGCCAGAA TCGACAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02700}
Olex 187	uh02700_LB_nest	CAGCGCACGATCCGAGCTCAAA G	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02700}
Olex 188	uh02700_RB_nest	CACCTCCTTATCCTCACTGCACA ATG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02700}
Olex 189	uh05948_LB_fw	CTGCCTACTTACACCTCCTTCTC GCCTGC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05948}
Olex 190	uh05948_LB_rv	GGCCATCTAGGCCTATTGCAAAA GCTGACAAAGATGAGG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05948} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 191	uh05948_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCACCCGCTCA CAGCGCAGTTCCAC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05948} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 192	uh05948_RB_rv	CGCCCTTCCAGCTTAGACAGCA G	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05948}
Olex 193	uh05948_LB_nest	GCTCCCAGAACGGTGGTCAGAT CTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{05948}
Olex 194	uh05948_RB_nest	GCCAATCCTCATCATCAACATGG CCTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{05948}
Olex 195	uh00127_LB_fw	GGCGACGCACACTACTTAGGAC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{00127}
Olex 196	uh00127_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGAACGTCCA AGTGTACTTCAAATG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{00127} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 197	uh00127_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCTGTGAGTAT CTCGTTAATGTTGGTCTTC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{00127} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 198	uh00127_RB_rv	GCTATCGATCCAAGTCCGACAAC GAGC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{00127}
Olex 199	uh00127_LB_nest	GTCGAAATATTCGGCAGTCCTGC GATG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{00127}
Olex 200	uh00127_RB_nest	CGAAGGATGTTGGTGGTACAGA GTTG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{00127}
Olex 201	uh00127_LB_seq_f	CACGGTGGTAGCATTTCATCGGAA TC	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{00127} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{00126} liegt
Olex 202	uh03203_LB_fw	GACAGAACACGCATTGCGAGCC CAC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03203}
Olex 203	uh03203_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGTGCACTAC TTGATTCGGGACGTTG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03203} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 204	uh03203_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCTGTGATTTG CGTTGCGTGCGTTTAAAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03203} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 205	uh03203_RB_rv	GTTTAGGTCCCGATACTGGCGAT CGG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03203}
Olex 206	uh03203_LB_nest	CCAATATCCACCACCGCCAGCA GAG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{03203}

Olex 207	uh03203_RB_nest	CACCTCAGCGTCAACCATAGACCTCG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{03203}
Olex 208	uh03203_LB_seq_f	GAGGATGTGTTTGCAGTCTACG	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{03203} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{03202} liegt
Olex 209	uh05270_LB_fw	GCAAAGACCCGTTTAGCACAGTCGAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05270}
Olex 210	uh05270_LB_rv	GGCCATCTAGGCCGCGGAGAGATGCGGAAGGATGAAG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05270} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 211	uh05270_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCATTGTGAGTGCTCAGTGAGGAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05270} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 212	uh05270_RB_rv	GAGTCAAGGTGGCAAGCTGTGGTGAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{05270}
Olex 213	uh05270_LB_nest	CAGTTGCGGGAACGAGCGATTCG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{05270}
Olex 214	uh05270_RB_nest	CATCCAGCAGCAACACCAGCAGCTC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{05270}
Olex 215	uh05270_LB_seq_f	GATTGACTCCGCTCGAAGGTTTGCTG	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{05270} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{05272} liegt
Olex 216	uh02811_LB_fw	GCTGCTGCTTGCCGACGTGATCTAC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02811}
Olex 217	uh02811_LB_rv	GGCCATCTAGGCCCTTGGCTTTGCTCTCGAAATGATCG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02811} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 218	uh02811_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCTGCTAAACATGCCGCCGAGGAAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02811} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 219	uh02811_RB_rv	GACACAGAAACACAAAGCGGCAGCAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{02811}
Olex 220	uh02811_LB_nest	CGATCGAGACACTGCTTCGCAAGCC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02811}
Olex 221	uh02811_RB_nest	CATGATGCTGCTGCTGAGTCTGGGCCGAAG	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{02811}
Olex 222	uh02811_LB_seq_f	CTGCATCAGAGGTCAATGCAGGAGC	sequenzieren der 5'-Flanke nach Deletion von UH_{02811} , da Rekombinationsstelle in Gen UH_{02810} liegt
Olex 223	uh03756_LB_fw	CGCCCTGTCTTAAAGCAGTAAGGATTCG	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03756}
Olex 224	uh03756_LB_rv	GGCCATCTAGGCCAAGCACCTCGCTGGTCTCGTTCAAATC	Amplifikation der 5'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03756} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 225	uh03756_LB_nest	GCAACAAACCAACATTGCACGACCC	nested PCR zum amplifizieren des Deletionskonstrukts ΔUH_{03756}
Olex 226	uh03756_RB_fw	GGCCTGAGTGGCCAGTGGCAAGGTACGATGGAGCTAAG	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03756} mit flankierender <i>Sfi</i> I-Schnittstelle
Olex 229	uh03756_RB_rv3	GATGGTTGTCCGTCTTGCCGTGCTC	Amplifikation der 3'-Flanke für das Deletionskonstrukt ΔUH_{03756}
ODA 80	UH_08049_fw (im ORF)	GAGGTCGCCAATATCGAC	Verifizierung der Deletion von UH_{08049} (von Daniela Aßmann)
ODA 81	UH_08049_rv (im ORF)	GGCGAGAGCATTAGCAGC	Verifizierung der Deletion von UH_{08049} (von Daniela Aßmann)
ODA 82	UH_08049_rv (hinter ORF)	GAGCCTGTCCGGTGCTTG	Verifizierung der Deletion von UH_{08049} (von Daniela Aßmann)
ODA 83	UH_16458_rv (hinter ORF)	GCGGTCGACATGTCTCTC	Verifizierung der Deletion von UH_{16458} (von Daniela Aßmann)

ODA 84	UH_16458_fw (im ORF)	GCCATCGCCGATATCGAC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_16458</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 85	UH_16458_rv (im ORF)	GACTGGCTTTGTGCGACC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_16458</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 86	UH_04865_rv (im ORF)	CCATGGATGATGCCACG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_04865</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 87	UH_04865_fw (im ORF)	CGACGAGGTTCTCATCG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_04865</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 88	UH_04865_rv (hinter ORF)	GCAGGTGGCAGATGCTGG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_04865</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 89	UH_03322_fw (im ORF)	GCCACGGTGGAGGATCTG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03322</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 90	UH_03322_rv (im ORF)	CCAGTGCTCTGAGCCTGC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03322</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 91	UH_14478_fw (im ORF)	CCGATCTTGCCTCCGTAG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_14478</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 92	UH_14478_rv (im ORF)	GTCAAGCTGCCCGCTAC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_14478</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 93	UH_05101_fw (im ORF)	GCCTTAACCGACGTGACG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_05101</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 94	UH_05101_rv (im ORF)	CTGCTGACGCTCCTGATC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_05101</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 95	UH_05101_rv (hinter ORF)	GAGACGAGAAGCGCCATC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_05101</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 96	UH_04984_rv (hinter ORF)	GCAGTCCGGCTCAAACCC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_04984</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 97	UH_04984_fw (im ORF)	GCCTGCTCGAACTTGGTC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_04984</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 98	UH_04984_rv (im ORF)	CTGCTGACCCTTGTGCTC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_04984</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 99	UH_02413_rv (hinter ORF)	CACCACACCTTCCCAACG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02413</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 100	UH_02413_fw (im ORF)	GCGATGACGAGGACGAGG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02413</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 101	UH_02413_rv (im ORF)	CCTCCTTCAACGTCCCAC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02413</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 102	UH_07510_fw (im ORF)	GGCACTGCCATTGCCATC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_07510</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 103	UH_07510_rv (im ORF)	CGGTCGTAGGAGTAGTCC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_07510</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 104	UH_07510_rv (hinter ORF)	GATTCAAGCCTCCGTTGC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_07510</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 105	UH_02700_fw (im ORF)	GCTGCTCAGGCTAGCATG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02700</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 106	UH_02700_rv (im ORF)	GTCGAGCATGATACCCTC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02700</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 107	UH_02700_rv (hinter ORF)	CAAATGCTGGCGTGGCGC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02700</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 108	UH_03203_rv (hinter ORF)	GATTCTCCTGACCCTGCG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03203</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 109	UH_03203_fw (im ORF)	CCTTGCCACCAAGAGGAC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03203</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 110	UH_03203_rv (im ORF)	GCTCAGCATCCCTCCTCG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03203</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 111	UH_13384_rv (hinter ORF)	CCTCGACCACAATCTCCC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_13384</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 112	UH_13384_fw (im ORF)	GAGGCGCACTAAGGTATC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_13384</i> (von Daniela Aßmann)

ODA 113	UH_13384_rv (im ORF)	GTAGTTCAGCGGCCAGG	Verifizierung der Deletion von <i>UH_13384</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 117	UH_02811_fw (im ORF)	CTCCTGATGCCGATAGCC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02811</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 118	UH_02811_rv (im ORF)	GCCTTGGTATCCCGACTC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_02811</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 119	UH_03756_rv (hinter ORF)	GCCACGAGTTCCACCTTC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03756</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 120	UH_03756_fw (im ORF)	CAGTAGCGCTGGCAGCAC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03756</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 121	UH_03756_rev (im ORF)	GCTTCGAGCCTTGCGCTC	Verifizierung der Deletion von <i>UH_03756</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 124	RT_uh_08049_fw	TCTGCTAGCGGTAGCTTC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_08049</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 125	RT_uh_08049_rv	GCTACTAGCGCCAGTTTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_08049</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 126	RT_uh_04865_fw	CCACCGATCCCACTCCAAAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_04865</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 127	RT_uh_04865_rv	CGCGAGCTAGAGCGTATACC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_04865</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 128	RT_uh_pit2_fw	ATCTACGCTGACTGGATCG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02064</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 129	RT_uh_pit2_rv	TGAACGTCGGATTCTGAAGG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02064</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 130	RT_uh_04984_fw	CCTAGAGGTGGAGCTAAGAAG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_04984</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 131	RT_uh_04984_rv	TTGCCGCTACTCCAGTATC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_04984</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 132	RT_uh_02413_fw	GTGCGGAGAGTTTGTGAAG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02413</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 133	RT_uh_02413_rv	ATGATCCTCCGTACACTCTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02413</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 134	RT_uh_16458_fw	CAATTGGGCCTGTGCAAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_16458</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 135	RT_uh_16458_rv	AATGCGCCATGACTTTCC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_16458</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 136	RT_uh_03322_fw	GTGGTGGTGGTGGAAATG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_03322</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 137	RT_uh_03322_rv	CTCTGCAGCAACTTCTGG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_03322</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 138	RT_uh_14478_fw	TTGACACGGTGGAAATGC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_14478</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 139	RT_uh_14478_rv	TCCTTTGGTGGGTCTCTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_14478</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 140	RT_uh_05101_fw	CAAGGACGATGGCACTTAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_05101</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 141	RT_uh_05101_rv	GTTTGGCCTGTCACTCTTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_05101</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 142	RT_uh_03756_fw	CTCATGCCAGCATCAGTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_03756</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 143	RT_uh_03756_rv	ACTCGTCCTTAACCCTAGC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_03756</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 144	RT_uh_02700_fw	TCTTGGCCCTAATGGTCC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02700</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 145	RT_uh_02700_rv	TCCTTGCTCCCGAGTTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02700</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 146	RT_uh_03203_fw	GAGACGGTGGGTAGTATCG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_03203</i> (von Daniela Aßmann)

ODA 147	RT_uh_03203 rv	CGCCTTGCACTCCTTAAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_03203</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 148	RT_uh_02811 fw	CGGAATGGAGCGAGTTTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02811</i> (von Daniela Aßmann)
ODA 149	RT_uh_02811 rv	CATCAGCAGCCTTGGTATC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>UH_02811</i> (von Daniela Aßmann)
-	M13 rev (-49)	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	Sequenzierung der Deletionskonstrukte im pCR@II-TOPO@-Vektor
-	M13 uni (-43)	AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	Sequenzierung der Deletionskonstrukte im pCR@II-TOPO@-Vektor
CH36	PHsp70-seq	AGTTTGCAGAACTCGCTGGTAG	Sequenzierung der Deletionskonstrukte im pCR@II-TOPO@-Vektor
CH37	TNos-seq	GCGCGGTGTCATCTATGTTAC	Sequenzierung der Deletionskonstrukte im pCR@II-TOPO@-Vektor
OlexRT3	HvGAPDH- RT_fw	GGCCGCAAGCTTTAACATC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvGAPDH</i>
OlexRT4	HvGAPDH- RT_rv	GGAACCCGGAAAGACATAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvGAPDH</i>
OlexRT5	UhPPI_RT_fw	TTCATCACCACCGTTGTC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>U. hordei ppi</i>
OlexRT6	UhPPI_RT_rv	AACCTTGGGCCTCGATAG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>U. hordei ppi</i>
OlexRT7	HvWRKY1_RT -fw	CAGTTCACCGACGTGGTC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvWRKY1</i>
OlexRT8	HvWRKY1_RT -rv	CATAGTGCTGCTGCTGAGT	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvWRKY1</i>
OlexRT9	HvWRKY2_RT -fw	GAAAGGTCAGCGGCATGAT	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvWRKY2</i>
OlexRT10	HvWRKY2_RT -rv	AGCGGTGGCGAAGGATTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvWRKY2</i>
OlexRT27	HvCalSyn_RT- fw	GTGAAGAGACTGGGTTTGTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvCalSyn</i> (AY177665)
OlexRT28	HvCalSyn_RT- rv	TCTGGAAGGTGGAGATGAAG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvCalSyn</i> (AY177665)
OlexRT43	HvWRKY22_R T-fw	GGAGAAACGGAAGCATCAG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvWRKY22</i>
OlexRT44	HvWRKY22_R T-rv	GCTTGGCTCCAAGAATGTC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvWRKY22</i>
OlexRT69	HvPR1_RT_fw	GGACTACGACTACGGCTCCA	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvPR1</i> (Schäfer et al., 2009)
OlexRT70	HvPR1_RT_rv	GGCTCGTAGTTGCAGGTGAT	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvPR1</i> (Schäfer et al., 2009)
OlexRT73	HvPR10_RT_f w	GGAGGGCGACAAGGTAAGTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvPR10</i> (Schäfer et al., 2009)
OlexRT74	HvPR10_RT_r v	CGTCCAGCCTCTCGTACTCT	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvPR10</i> (Schäfer et al., 2009)
OlexRT77	HvATG8_RT_f w	CCGACTGCTTCGTTGATG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG8</i> (AK248733)
OlexRT78	HvATG8_RT_r v	GAAAGTGTTCGCCACTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG8</i> (AK248733)
OlexRT79	HvATG9_RT_f w	AAATCCTCCACGAGCCTTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG9</i> (AM085509)
OlexRT80	HvATG9_RT_r v	CATCGGCGAAATGAAGACC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG9</i> (AM085509)
OlexRT81	HvATG5_RT_f w	TGGACATACCGTTCCTCTG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG5</i> (AK362511)
OlexRT82	HvATG5_RT_r v	CAAGCGCTGACGTATACAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG5</i> (AK362511)

OlexRT83	HvATG12_RT_fw	CAGACGAGCTGGTAATTGAC	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG12</i> (MLOC_55538.2)
OlexRT84	HvATG12_RT_rv	CGCTGCCGATAAAGCATAG	qRT-PCR zur Detektion der Expression von <i>HvATG12</i> (MLOC_55538.2)

¹ in der Sequenz enthaltenen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt

4.3.6 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. Alle verwendeten Plasmide vermitteln Ampicillin-Resistenz.

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 zur Blau-Weiß-Selektion verwendet werden. Die Sequenzierung der Inserts ist mittels M13 rev (-49)- und M13 uni (-43)-Primern möglich.

pBS-hhn (Kämper, 2004)

Enthält eine 1884 bp lange Hygromycin-Resistenzkassette flankiert von unterschiedlichen *SfiI*-Schnittstellen. Das *hph*-Gen wird von dem *hsp70*-Promotor und den *nos*-Terminator kontrolliert. Die aus pBS-hhn gewonnene Resistenzkassette wurde standardmäßig für Deletionskonstrukte verwendet.

pCRII-TOPO ΔUH_02064 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_02064 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Kon-

strukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_00127 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_00127 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_02413 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_02413 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_02700 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_02700 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromy-

cin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_02811 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_02811 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_03203 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_03203 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_03322 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_03322 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_03756 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_03756 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_04865 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_04865 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_04984 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_04984 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_05101 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_05101 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Kon-

strukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_05270 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_05270 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_05948 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_05948 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_07510 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_07510 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_08049 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_08049 , bestehend aus der 5'-

und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_13384 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_13384 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_14478 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_14478 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

pCRII-TOPO ΔUH_16458 (diese Arbeit)

Plasmid enthält das Deletionskonstrukt für ΔUH_16458 , bestehend aus der 5'- und der 3'-Flanke, welche die Hygromycin-Resistenzkassette einschließen. Die Resistenzkassette stammt aus dem Vektor pBS-hhn. Das Einbringen des Konstrukts erfolgte mittels Topoisomerase-Aktivität.

4.4 Mikrobiologische Standardmethoden

4.4.1 Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} ≈ 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 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 Sekunden bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 200 µl dYTMedium versetzt und 30-60 min bei 800 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformations-Ansatz wurde auf selektiven YT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

RF1-Lösung

100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
 30 mM K-Acetat
 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 15% (v/v) Glyzerin
 in H₂O_{bid.}, pH 5,8 (Acetat), sterilfiltriert

RF2-Lösung

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 15% (v/v) Glyzerin
 in H₂O_{bid.}, pH 5,8 (NaOH), sterilfiltriert

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

Die korrekte Insertion eines Konstrukts in pCRII-TOPO resultiert in einer Unterbrechung des *lacZ*-Gens, sodass keine funktionelle β-Galactosidase exprimiert wird, welche 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. Hierfür werden 100 µl einer 2%igen X-Gal-Lösung ca. 1 h vor Ausplattieren des Transformations-Ansatzes auf die selektive YT-Platte aufgetragen.

4.4.3 Transformation von *U. hordei*

Zur Transformation von *U. hordei* wurde ein nach Schulz et al. (1990) und Gillissen et al. (1992) modifiziertes Protokoll verwendet. Von einer auf Platte frisch herangezogenen Kultur wurde eine Übernachtskultur (22 °C, 200 U/min) in 50 ml YEPS angesetzt. Bei einer $OD_{600} = 0,4 - 0,8$ wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (3.500 Upm, 10 min, Biofuge Stratos), einmal mit 25 ml SCS gewaschen und anschließend in 2 ml SCS mit 3,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die so gestartete Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt, da die Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nachdem etwa 50 – 70 % der Zellen mit der Protoplastierung begonnen haben (15 - 30 min), wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Biofuge Stratos) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschschrift dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten wurden direkt transformiert oder aliquotiert (à 50 µl) bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt. Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit max. 10 µl linearisierter DNA (bis zu 5 µg) und 1 µl 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 15 ml Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen, die das entsprechende 2x konzentrierte Antibiotikum in 15 ml Bottom-Agar enthält. Nach 5 bis 7 Tagen Inkubation bei 22°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt. Potenzielle Transformanten wurden mittels PCR-basierter Analyse verifiziert.

<u>SCS-Lösung</u>	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
<u>STC-Lösung</u>	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl ₂ 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert

<u>STC/PEG-Lösung</u>	15 ml STC 10 g PEG4000
<u>Regenerations-Agar</u> (Schulz et al., 1990)	Top: 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1M Sorbitol in YEPS _{light} Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt-konzentriertes Antibiotikum

4.4.4 Test auf filamentöses Wachstum von *U. hordei* und *U. maydis*

U. hordei- und *U. maydis*-Stämme wurden in YEPS_{light} Flüssigmedium bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,8 aerob inkubiert (22°C bzw. 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_{600nm} von 3 eingestellt wurde. 5 µl jeder Suspension wurden auf Aktivkohle-haltige PD-Platten getropft. Nach dem Eintrocknen wurde die Platte mit Parafilm versiegelt und für *U. maydis* für 24 h bei 28°C, für *U. hordei* für min. 36-48 h bei 22°C inkubiert. Filamentöses Wachstum war anhand der Bildung eines weißen Luftmyzels erkennbar.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA-Präparation wurde mit Puffern der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Dazu wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und durch Vortexen gemischt. Zur Zell-Lyse wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben, die Proben durch mehrfaches Invertieren gemischt und für 1-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proteine zu fällen und die Lösung zu neutralisieren, wurden 300 µl Puffer P3 hinzupipettiert, durch Invertieren gemischt und für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und 600 µl Isopropanol zur DNA-Fällung hinzugegeben. Die Mischung wurde invertiert und zur Fällung der DNA für 20 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurde das DNA-Pellet kurz getrocknet und 30 - 50 µl H₂O_{bid.} resuspendiert.

4.5.2 Isolierung genomischer DNA aus *U. hordei*

Hierfür wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hoffmann & Winston (1987) verwendet. 2 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert (2 min, 13.000 U/min, RT, Heraeus Biofuge), der Überstand verworfen, 400 µl *Ustilago*-Lysis-Puffer, 500 µl Phenol/Chloroform und ca. 0,2 ml Glasperlen zugegeben und der Ansatz 5 min auf einem Vortexer (IKA Vibrax VXR) geschüttelt. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm. Etwa 350 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation (2 min, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge) wurde der Überstand abgenommen und das Sediment in 50 µl TE/RNase (50 µg/ml) resuspendiert (15 min, 55 °C, 750 U/min, Thermomixer (Eppendorf)). Die DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

4.5.3 Isolierung genomischer DNA aus Gerste

Genomische DNA zur Überprüfung der Transgenität von Gerstenpflanzen wurde mittels des ‚REExtract-N-AmpTM Plant Tissue Kit‘ der Firma Sigma-Aldrich (Dürheim) nach Herstellerangaben präpariert.

4.5.4 Isolierung von RNA aus infiziertem Gerstengewebe

Für die Extraktion von RNA aus infiziertem Gerstengewebe wurden die jeweils infizierten Blattbereiche geerntet und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattstücke wurden anschließend mit Hilfe eines Mörsers unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert. Die RNA wurde aus dem resultierenden Pulver mittels der TRIzol®-Extraktionsmethode (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben extrahiert.

Alternativ wurde RNA aus infiziertem Blattmaterial mit Hilfe des ‚RNeasy® Mini Kit‘ der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert.

Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND_1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific/Fisher Scientific, Schwerte).

4.5.5 Aufreinigung von RNA

Die Aufreinigung extrahierter RNA wurde mit dem ‚RNeasy® Mini Kit‘ der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte im Anschluss durch photometrische Messung am NanoDrop ND_1000 Spektrophotometer (Thermo Scientific/Fisher Scientific, Schwerte).

4.5.6 Gleichzeitige Isolierung von DNA und RNA aus infiziertem Gerstengewebe

Für die gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA aus infiziertem Gerstengewebe wurden die jeweils infizierten Blattbereiche geerntet und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattstücke wurden anschließend mit Hilfe eines Mörsers unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert. Sowohl die DNA, als auch die RNA wurden aus dem resultierenden Pulver mit Hilfe des ‚*MasterPure Complete DNA & RNA Purification Kit*‘ der Firma Biozym (Oldendorf) nach Herstellerangaben extrahiert.

4.5.7 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

4.5.7.1 Restriktion

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

0,5 – 2 µg reine DNA
 2 µl enzyspezifischer 10 x NEB-Puffer 1-4
 ggf. 2 µl 10x BSA
 0,5 U Restriktionsendonuklease
ad 20 µl mit H₂O_{bid.}

4.5.7.2 Dephosphorylierung linearer DNA

Eine Dephosphorylierung kam zum Einsatz, wenn z.B. eine *blunt-end*-Ligation erwünscht war. Hierbei wurde jeweils die 5'-Phosphatgruppe der endständigen Nukleotide abgespalten. Verwendet wurde die alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim) oder die antarktische Phosphatase (NEB, Frankfurt a.M.). Die Dauer und Temperatur der Inkubation waren vom verwendeten Enzym abhängig. Ein typischer Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

20 µl Restriktionsansatz
 10 µl Dephosphorylierungspuffer
 25 U alkalische / antarktische Phosphatase
ad 100 µl mit H₂O_{bid.}

4.5.7.3 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 1:3 bis 1:10 eingesetzt.

In Ligationen, bei denen zwei Flanken mit einer Restriktionskassette (für *U. hordei* Deletionskonstrukte) gekoppelt werden sollten, wurden die Flankenfragmente in einem molaren Verhältnis von 2:1 gegenüber der Resistenzkassetten-DNA eingesetzt. Die Ligationen wurden für mindestens zwei Stunden (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 H₂O_{bid.}

4.5.8 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 abkühlen 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 wandert die Nukleinsäuren als poly-Anion langsam (in Abhängigkeit von Größe und Agarosekonzentration) in Richtung Anode. Sichtbar gemacht wurde die Nukleinsäuren durch UV-Bestrahlung bei 254 nm. Die Dokumentation fand mit der Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System, UVP) statt.

<u>5x TBE-Puffer</u>	440 mM Tris-Base 440 mM Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
<u>50x TAE-Puffer</u>	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, sterilfiltrieren

4.5.9 Aufreinigung von Nukleinsäuren

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

4.5.10 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 enthaltenen Komponenten angegeben. Außerdem wird das PCR Programm, vereinfacht nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung/Dauer – [Denaturierung – Anlagerung – Elongation] x Zahl der Zyklen – finale Elongation. 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 Biometra® Tpersonal oder Biometra® Tprofessional durchgeführt.

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

Ansatz	ca. 100 ng 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; Novagen/Merck, Darmstadt):

Ansatz	ca. 100 ng 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

4.5.11 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Alle Sequenzierreaktionen wurden extern von dem Sequenzier-Service der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt und beruhen auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977).

4.5.12 Quantitative *real-time* PCR

Für quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurden mögliche DNA-Reste in den RNA-Proben mit Hilfe des 'Turbo DNA-free' Kits (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt. Die isolierte RNA wurde anschließend mit dem 'First Strand cDNA Synthesis Kit' (Fermentas) nach Herstellerangaben in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde folglich für die qRT-PCR Reaktionen eingesetzt, welche mit Hilfe des 'iQTM SYBR® Green Supermix'-Kits der Firma Bio-Rad (Dreieich) 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 Expressionswerte wurden mit Hilfe des Programmes *Gene Expression Macro* (Bio-Rad, München) bzw. mit dem REST© *relative expression software tool* (Qiagen, Hilden) (Pfaffl et al., 2002) berechnet.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung löslicher Proteine in Proteinextrakten wurde mit Hilfe der Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA; *bovine serum albumin*) verwendet.

4.6.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus Gerste

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden die infizierten Blattbereiche von infizierten Gerstenpflanzen (Golden Promise) geerntet und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattstücke wurden anschließend mit Hilfe eines Mörsers unter fortwährender Stickstoffkühlung homogenisiert. Das gefrorene Pflanzenpulver wurde in 1 ml Portionen in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und anschließend auf Eis angetaut. Das angetaute Material wurde mit Extraktionspuffer auf 2 ml aufgefüllt und Zelltrümmer für 3x für 10 min bei 4°C und 13.000 Upm in der Tischzentrifuge pelletiert. Der bräunliche Überstand wurde durch einen 35 µm Nylon-Filter (BD Biosciences, Heidelberg) von verbliebenem unlöslichem Material befreit und für die direkte Anwendungen im Caspase-Aktivitätstests (vgl. 4.6.3) genutzt.

<u>Extraktionspuffer</u>	10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.3
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	2 mM DTT
	20 µM E-64
	1x Aprotinin

4.6.3 Caspase-Aktivitätstest

Für den Aktivitätstest wurden die verwendeten Proteinextrakte (vergl. 4.6.2) nach Bradford-Messung auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Als selektives Fluoreszenzmarkiertes Substrat zur Detektion der DEVDase-Aktivität diente Ac-DEVD-MCA (Acetyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid α -(4-methyl- coumaryl- 7- amide)), welches spezifisch durch die Effektor-Caspase-3 gespalten werden kann. Dabei kommt es zur Freisetzung einer fluoreszierenden Gruppe, deren Fluoreszenz bei 460 nm detektiert werden kann (Zimmermann et al., 1976).

Für den Assay wurde ein Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt, bestehend aus 80 µl Proteinextrakt (1 mg/ml), 100 µM Substrat (10 µl) und 10 µl Extraktionspuffer (vergl. 4.6.2). Als Kontrolle wurden 80 µl Proteinextrakt mit 100 µM (10 µl) des spezifischen

Inhibitor-Peptids Ac-DEVD-CHO (Acetyl-L-aspartyl-L-glutaminy-L-threonyl-L-aspart-1-aldehyd) für 10 min inkubiert und anschließend das Substrat zugegeben. Anschließend wurde der Anstieg der Fluoreszenz mittels einer Kinetikmessung mit einem Fluorimeter (Tecan, Männedorf; Schweiz) über einen Zeitraum von 60 min bestimmt.

Substrat und Inhibitor basieren auf Nicholson et al. (1995), Enari et al. (1996) und Thornberry et al. (1997) und wurden von der Firma Peptanova (Sandhausen) bezogen.

4.6.4 Gewinnung von Apoplastenflüssigkeit

Zur Isolation der Apoplastenflüssigkeit infizierter Blattbereiche wurden diese mit gerader Schnittkante horizontal abgeschnitten und sofort in Eiswasser gegeben. Nach Bestimmung des Frischgewichts der geernteten Blätter, wurden diese in einem Exsikkator für 3-5 Mal für jeweils 5 min bei 100 mbar, unter $H_2O_{bid.}$ vakuumfiltriert. Die evakuierten Blätter wurden anschließend mit der Schnittkante nach unten gestapelt und vorsichtig in eine 5 ml Spritze geschoben. Um die Apoplastenflüssigkeit aus den Blattstücken zu isolieren wurde die Spritze mit der kleinen Öffnung nach unten in ein 15 ml Falcon-Gefäß gegeben und für 20 min bei 2500 g und 4°C zentrifugiert. Auf diese Weise erhält man aus den infizierten Blattbereichen von ca. 15 Pflanzen etwa 80-120 µl Apoplastenflüssigkeit, die zur Bestimmung der darin enthaltenen H_2O_2 -Konzentration direkt in einem Xylenolorange-Assay (vergl. 4.6.5) verwendet wurde.

4.6.5 Nachweis von Wasserstoffperoxid durch Xylenolorange-Färbung

Zur Messung der H_2O_2 -Konzentration in frisch isolierter Apoplastenflüssigkeit infizierter Gerstenblätter (vergl. 4.6.4) wurden 10 µl Apoplastenflüssigkeit mit 90 µl des Xylenolorange-Reagenz gemischt. Hierfür wurden zuvor frisch 0,5 ml Reagenz A mit 50 ml Reagenz B gemischt. Anschließend erfolgte eine Kinetikmessung der Absorption bei 560 nm über einen Zeitraum von 60 min mit einem Fluorimeter (Tecan, Männedorf; Schweiz). Die Bestimmung der relativen Menge an Wasserstoffperoxid in der jeweiligen Apoplastenflüssigkeit erfolgte anhand der steigenden Absorption durch den Farbumschlag der Lösung. Für jede Probe wurden jeweils mind. 5 technische Replikate gemessen.

<u>Reagenz A</u>	25 mM $FeSO_4$ 25 mM $(NH_4)_2SO_4$ in 2,5 M H_2SO_4
<u>Reagenz B</u>	125 µM Xylenolorange 100 mM Sorbitol in $H_2O_{bid.}$

4.7 Pflanzenmethoden

4.7.1 Verwendete Gerstenkultivare (*Hordeum vulgare* sp.)

Für Pflanzenspritzinfektionen wurde der Gerstenkultivar ‚Golden Promise‘ (Interdisziplinäres Forschungszentrum, Gießen) verwendet.

Die transgenen *Bax Inhibitor-1*-überexprimierenden Linien E14L1, E4L3 und E15L7 (Babaeizad et al., 2009) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ralph Hückelhoven (TU München, Freising/Weihenstephan) zur Verfügung gestellt.

4.7.2 Kultivierung von *H. vulgare*

Gerstenpflanzen des Kultivars ‚Golden Promise‘ und der *BI-1*-überexprimierenden transgenen Linien wurden in Phytokammern der Fima Conviron (Winnipeg; Kanada) oder Vötsch (Balingen) kultiviert. Die Nachtphase mit 18°C und 60% Luftfeuchte dauerte 8 h, die Tagphase mit 22°C und 60% Luftfeuchte 16 h, wobei 1 h auf die Simulation des Sonnenaufgangs und 1 h für die Simulation des Sonnenuntergangs entfielen („ramping“). Die Beleuchtung betrug während der Tag Phase in der Conviron-Kammer mindestens 26000 Lux und in der Vötsch-Kammer durchschnittlich 39000 Lux. Jeweils fünf Gerstenkörner wurden in Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert.

4.7.3 Infektion von *H. vulgare* mit *U. hordei* und *U. maydis*

Die zu infizierenden Stämme wurden über Nacht in YEPS_{light}-Flüssigkultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-1,0 angezogen. Anschließend wurde die Kultur geerntet und in 0,1% Tween20 resuspendiert, so dass eine OD_{600nm} von 3,0 erreicht wurde. Bei Standard-"Spritzinfektionen" wurden 100 bis 200 µl der jeweiligen *Ustilago*-Suspensionen in das Innere des Blattwirtels von zehn Tage alten Gerstenpflanzen 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 die Infektionen wurden die beiden korrespondierenden Suspensionen kompatibler Stämme in einem 1:1-Verhältnis gemischt.

4.7.4 Infiltration von *H. vulgare* mit Chitosan

Die Infiltration infizierter Blattbereich mit Chitosan (7 mg/ml in H₂O) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) erfolgte 2 Tage nach der Infektion. Hierzu wurde die Flüssigkeit unter leichtem Druck mit einer 1 ml Spritze ohne Nadel über die Blattunterseite ins Blatt gedrückt.

mindestens 4-5 Mal in PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Färbelösung wurde daraufhin in einem Exsikkator 3-4 Mal für jeweils 5 min bei 100 mbar vakuumfiltriert. Nach erfolgter Färbung wurden die Blattproben in PBS transferiert und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Mikroskopie gelagert.

<u>WGA-AF488-Stammlösung</u>	1 mg/ml in H ₂ O Lagerung bei 4°C
<u>Propidiumiodid-Stammlösung</u>	10 mg/ml in PBS (pH 7,4) Lagerung dunkel
<u>PBS (pH 7,4)</u>	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 137 mM NaCl in H ₂ O _{bid.}
<u>Färbelösung</u>	20 µg/ml Propidiumiodid 10 µg/ml WGA-AF488 0,1% Tween20 in PBS (pH 7,4)

4.8.4 Färbung mit FDA/FM4-64 und Calcofluor White

Zur Differenzierung zwischen lebendigen und toten Pflanzenzellen in infizierten Blattbereichen wurde der Lebend-Zellmarker Fluoreszein-Diacetat (FDA; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet. Durch zytoplasmatische Esterase Aktivität wird FDA in ein fluoreszierendes Produkt umgewandelt. So leuchten lebenden Zellen (die Esterase-Aktivität besitzen) nach Anregung grün. Eine Gegenfärbung von Pflanzenmembranen erfolgte mit FM4-64 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe). Die Färbelösung wurde in einem Exsikkator 3-4 Mal für jeweils 5 min bei 100 mbar vakuumfiltriert. Pilzstrukturen auf der Blattoberfläche wurden zusätzlich durch Färbung mit Calcofluor White (vergl. 4.8.2) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Blattfragmente per konfokaler Mikroskopie analysiert.

Fluoreszein-Diacetat-Stammlösung	1 mg/ml in Aceton (frisch hergestellt)
FM4-64	1 mg/ml in DMSO
Färbelösung	0,5 µl FDA 0,5 µl FM4-64

4.8.5 Färbung mit Diaminobenzidin

Für Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen wurden Blattspreiten infizierter Pflanzen in voller Länge geerntet und mit der Schnittfläche für 12 h in einer 1 mg/ml DAB-Tetrahydrochlorid-Lösung inkubiert (dunkel bei RT). Anschließend wurden die Blätter in einem Ethanol-Chloroform-Gemisch (4:1) für 1-2 Tage im Dunkeln bei 4°C entfärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Konserviert wurden die Präparate in 60 % Glycerin bei dunkler Lagerung (RT). Der Pilz wurde durch Gegenfärbung mit Calcofluor White (vergl. 4.8.2) sichtbar gemacht. Die mikroskopische Analyse erfolgte im Hellfeld und mittels Fluoreszenzmikroskopie.

4.8.6 Färbung mit Trypanblau

Das zugeschnittene Blatt wurde in die Trypanblau-Färbelösung gelegt und für 8 min im Thermomixer bei 99°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 h lang auf Raumtemperatur abgekühlt bevor die Färbelösung gegen die Entfärbelösung ausgetauscht wurde. Die Entfärbung erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Proben in 50 % Glycerin konserviert. Zur parallelen Visualisierung der Pilzstrukturen wurden die gefärbten Blätter mit WGA-AF488 gegengefärbt (30 min bei RT). Die mikroskopische Analyse erfolgte im Hellfeld und mittels Fluoreszenzmikroskopie.

<u>Stammlösung</u>	10 ml Milchsäure 10 g Phenol 10 ml Glycerin 10 ml H ₂ O 10 mg Trypanblau
<u>Färbelösung</u>	1:1 Mischung der Stammlösung mit Ethanol
<u>Entfärbelösung</u>	2,5 g/ml Chloralhydrat in H ₂ O

4.8.7 Färbung mit Monodansylcadaverin

Monodansylcadaverin (MDC; Biomol, Hamburg) ist eine autofluoreszierende Substanz, die verwendet wird, um Autophagie in Pflanzen zu detektieren. Es handelt sich hierbei eine schwache Base, die biologische Membranen passieren kann und sich in sauren Kompartimenten, wie Autophagosomen oder Endosomen, anreichert (Biederbick *et al.*, 1995). Für die MDC-Färbungen wurden infizierte Blattareale in einem Exsikkator 3-4 Mal für jeweils 5 min bei 100 mbar mit einer 0,5 mM Färbelösung vakuumfiltriert. Eine Gegenfärbung von Pflanzenmembranen erfolgte mit FM4-64 (Molecular Probes/Invitro-

gen, Karlsruhe), sowie mit 10 µg/ml WGA/AF-488 (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) zur Visualisierung der Pilzhypen. Anschließend wurden die Blattfragmente per konfokaler Mikroskopie analysiert.

4.8.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologischen Betrachtungen von *U. maydis* und *U. hordei* 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 Apertur verwendet.

Digitale Aufnahmen einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742, Hamamatsu) wurden mit den Programmen MetaMorph (Version 6.2r6), Photoshop 5.5 (Adobe) und/oder CANVAS 6.0 (Deneba) bearbeitet (Bildausschnitt, Kontrast, Helligkeit).

4.8.9 Transmissionselektronenmikroskopie

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

5 Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R. B., Janjusevic, R., Stebbins, C. E. und Martin, G. B.** (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 2851–2856.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. und Martin, G.B.** (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO* 22: 60-69.
- Antonsson, B.** (2004). Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 256/257: 141–155.
- Apel, K. und Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399.
- Apostol, I., Heinstejn, P.F., und Low, P.S.** (1989). Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells: Role in Defense and Signal Transduction. *Plant physiol* 90, 109-116.
- Arias, E. und Cuervo, A.M.** (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:184–89
- Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Pritchard, L., Bos, J.I., Venter, E., Avrova, A.O., Rehmany, A.P., Böhme, U., Brooks, K., Cherevach, I., Hamlin, N., White, B., Fraser, A., Lord, A., Quail, M.A., Churcher, C., Hall, N., Berriman, M., Huang, S., Kamoun, S., Beynon, J.L. and Birch, P.R.** (2005) An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7766–7771.
- Ausubel, F.M., Brenz, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. und Strukl, K.** (1987). Current protocols in molecular microbiology. *John Wiley & Sons, Inc., USA.*
- Babaeizad, V., Imani, J., Kogel, K.H., Eichmann, R. und Hückelhoven, R.** (2009) Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theor Appl Genet* 118: 455–463.
- Baehrecke, E.H.** (2002). How death shapes life during development. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 3: 779-787
- Baidez, A.G., Gomez, P., Del Rio, J.A. und Ortuno, A.** (2007). Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3373- 3377.
- Bajt, M.L., Cover, C., Lemasters, J.J. und Jaeschke, H.** (2006). Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. *Toxicol. Sci.* 94, 217–225.
- Baker, C.J. und Orlandi, E.W.** (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu rev phytopath* 33, 299-321.

- Bakkeren, G. und Kronstad, J.W.** (1993). Conservation of the b Mating-Type Gene Complex among Bipolar and Tetrapolar Smut Fungi. *The Plant Cell* 5: 123-136.
- Bakkeren, G. und Kronstad, J.W.** (1994). Linkage of Mating-Type Loci Distinguishes Bipolar from Tetrapolar Mating in Basidiomycetous Smut Fungi. *PNAS* 91: 7085-7089.
- Bakkeren, G. und Kronstad, J.W.** (2007). Bipolar and tetrapolar mating systems in the Ustilaginales. In: Sex in fungi: molecular determination and evolutionary Implications, Eds. J. Heitman, J. W. Kronstad, J. Taylor, L. Casselton. American Society for Microbiology (ASM) 389-404.
- Bakkeren, G., Kamper, J. und Schirawski, J.** (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol* 45 Suppl 1, 15-21.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu rev Genet* 29, 179-208.
- Banuett, F.** (2007) History of the mating types in *Ustilago maydis*. In Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications. Washington, DC, ASM Press.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989) Different a alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5878–5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Dev.* 122: 2965-2976.
- Basse, C.W. und Steinberg, G.** (2004) *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol. Plant. Pathol.* 5, 83–92.
- Bassham, D.C.** (2007). Plant autophagy-more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 587-593.
- Bauer, R., Begerow, D., Sampaio, J.P., Weiß, M. und Oberwinkler, F.** (2006). The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycol. Progress* 5: 41–66.
- Begerow, D., Stoll, M. und Bauer, T.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98(6): 906-916.
- Bernoux, M., Ellis, J.G. und Dodds, P.N.** (2011). New insights in plant immunity signaling activation. *Curr Opin Plant Biol.* 14(5):512-8.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H. und Mansfield, J.W.** (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Plant Cell* 9, 209-221.
- Bhuiyan, N.H., Selvaraj, G., Wei, Y. und King, J.** (2009). Role of lignification in plant defense. *Plant Sig Beh* 4, 158-159.
- Biederbick, A., Kern, H.F. und Elsässer, H.P.** (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol.* 66(1):3-14.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B. und Andrews, D.W.** (2008). Bcl-XL

- Inhibits Membrane Permeabilization by Competing with Bax. *PLoS Biology* 6: 1268-1280.
- Birch, P.R.J., Rehmany, A.P., Prichard, L., Kamoun, S. und Beynon, J.L.** (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Tr. Mikrobiol.* 14, 8-11.
- Boch, J. und Bonas, U.** (2010) Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol.* 48:419-436.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. und Bonas, U.** (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326:1509-1512.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E. und Jensen, R. G.** (1995) Adaptations to Environmental Stresses. *Plant Cell* 7, 1099 –1111
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R.** (1995) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* 73, 320–325.
- Boller, T. und Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Rev Plant Biol* 60, 379-406.
- Boller, T. und He S. Y.** (2009). Pattern Recognition Receptors in Plants and Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324: 742-744.
- Bos, J.I., Kanneganti, T.D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R. und Kamoun, S.** (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.
- Bos, J.I.B., Chaparro-Garcia, A., Quesada-Ocampo, L.M., McSpadden Gardener, B.B. und Kamoun, S.** (2009) Distinct amino acids of the *Phytophthora infestans* effector AVR3a condition activation of R3a hypersensitivity and suppression of cell death. *Mol Plant Microbe Interact* 22:269–281.
- Bozhkov, P.V., Smertenko, A.P. und Zhivotovsky, B.** (2010). Aspasing out metacaspases and caspases: proteases of many trades. *Sci. Signal.* 3, pe48.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfieldm M.J. und Kamoun, S.** (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr Opin Plant Biol* 15: 483-492.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M., Huitema, E., van der Hoorn, R.A. und Kamoun, S.** (2011). *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20832-20837.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. und Kahmann, R.** (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.

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. und Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu Rev Phytopath* 47, 423-445.

Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J. und Bolwell, G. P. (1998). Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J.* 15:333-343.

Bufe, A., Spangfort, M.D., Kahlert, H., Schlaak, M. und Becker W.-M. (1996). The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* 199:413-15

Burdon, J. J. und Thrall, P. H. (2003). The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biol.* 4, 227.1-227.3

Büttner, D. und Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology* 9:193-200

Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P. und Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science* 115(24):4727-4734.

Chae, H.J., Ke, N., Kim, H.R., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M. et al. (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323: 101-113.

Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406: 855-862.

Chichkova, N.V., Shaw, J., Galiullina, R.A., Drury, G.E., Tuzhikov, A.I., Kim, S.H. et al. (2010). Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *EMBO J* 29: 1149-1161.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. und Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814.

Coffeen, W.C. und Wolpert, T.J. (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* 16, 857-873.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *PNAS USA* 69, 2110-6.

Coll, N.S., Epple, P. und Dangl, J.L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Diff* 18, 1247-1256.

Contento, A.L., Xiong, Y. und Bassham, D.C. (2005). Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J.* 42(4):598-608.

Da Cunha, L., McFall, A.J. und Mackey, D. (2006). Innate immunity in plants: a

continuum of layered defenses. *Microbes and Infection* 8: 1372-1381.

Dangl, J.L. und Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411(6839): 826-833.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A. und Richberg, M.H. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8(10): 1793-1807.

Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. und Bolwell, G.P. (2012). The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity. *Plant Cell* 24, 275-287.

de Jonge, R., und Thomma, B.P. (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* 17, 151-157.

de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., und Thomma, B.P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329, 953-955.

de Torres, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammouneh, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M. und Boch, J. (2006). Pseudomonas syringae effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. *Plant J.* 47, 368–382.

de Wit, P.J.G.M. (2007). Visions & reflections (minireview) - How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2726-2732.

De Wit, P.J.G.M., Mehrabi, R., Van den Burg, H.A. und Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol Plant Pathol* 10, 735-747.

Degtarev, A., Boyce, M. und Yuan, J. (2001). The channel of death. *J. Cell Biol.* 155(5): 695-697.

Del Pozo, O. und Lam, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol.* 8(24):R896.

Delgado, M.A. und Deretic, V. (2009). Toll-like receptors in control of immunological autophagy. *Cell Death Differ.* 16(7):976-83.

Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G. und Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 27: 1110–1121.

Denton, D., Nicolson, S. und Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 19: 87-95.

Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T. und French, R. (2001). Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS* 98(12): 6957-6952.

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

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

- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet.* 8(9): 302-307.
- Doehlemann, G. und Hemetsberger, C.** (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* 198(4):1001-16.
- Doehlemann, G., Reissmann, S., Aßmann, D., Fleckenstein, M. und Kahmann, R.** (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Mol Microbiol* 81, 751-766.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. und Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis* is required for successful invasion of plant cells. *Plos Pathog.* 5, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. und Kämper, J.** (2008b). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J.* 56: 181-195.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vraneš, M., De Vries, R.P., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2008a). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J. Plant Physiol.* 165: 29-40.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X. und Tyler, B.M.** (2008). RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* 20(7): 1930-1947.
- Doukhanina, E.V., Chen, S., van der Zalm, E., Godzik, A., Reed, J. und Dickman, M.B.** (2006). Identification and Functional Characterization of the BAG Protein Family in *Arabidopsis thaliana*. *J. Bio. Chem.* 281(27):18793-18801.
- Ebba, T., und Person, C.** (1975). Genetic control of virulence in *Ustilago hordei*. IV. Duplicate genes for virulence and genetic and environmental modification of a gene-for-gene relationship. *Can. J. Genetics and Cytology* 17:631–636.
- Eichmann, R.** (2005). Molecular Analyses on the Mechanism of Nonhost Resistance of Barley (*Hordeum vulgare* L.) to the Wheat Powdery Mildew Fungus (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*). *Dissertation*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Eichmann, R., Biemelt, S., Schäfer, P., Scholz, U., Jansen, C., Felk, A., Schäfer, W., Langen, G., Sonnewald, U., Kogel, K.H. und Hüchelhoven, R.** (2006). Microarray expression analysis of barley susceptibility and nonhost resistance to *Blumeria graminis*. *J Plant Physiol* 163(6): 657-670.
- Eichmann, R., Bischof, M., Weis, C., Shaw, J., Lacomme, C., Schweizer, P., Duchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J. und Hüchelhoven, R.** (2010). BAX INHIBITOR-1 is required for full susceptibility of barley to powdery mildew. *MPMI* 23, 1217–1227.
- Eichmann, R., Holger, S., Kogel, K.-H. und Hüchelhoven, R.** (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.

Ellis, J.G. und Dodds, P.N. (2011). Showdown at the RXLR motif: serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14381-14382.

Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W. und Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380(6576):723-6.

Enoksson, M und Salvesen, G.S. (2010). Metacaspases are not caspases – always doubt. *Cell Death Differ.* 17, 1221.

Esfandiari, N., Kohi Habibi, M., Mosahebi, G.H. und Mozafari, J. (2005). Detection of Alfalfa mosaic virus (AMV) in pea field in Iran. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70: 407–410.

Faulkner, C. und Robatzek, S. (2012). Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology* 15:699–707

Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. und Kahmann, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* 7: 666-672.

Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M. und Jaskolski, M. (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS J.* 280(5):1169-99.

Fernández, M.B., Daleo, G.R. und Guevara, M.G. (2012). DEVDase activity is induced in potato leaves during *Phytophthora infestans* infection. *Plant Physiol Biochem.* 61:197-203.

Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu rev Phytopathol* 9, 275-296.

Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S. und Oliver, R.P. (2008). Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.* 10(7): 1421-1428.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlan, P., Nunez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.-U., Vandanabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. und Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 19, 107–120.

Gaudet, D.A., Wang, Y., Penniket, C., Lu, Z.X., Bakkeren, G, Laroche, A. (2010). Morphological and molecular analyses of host and nonhost interactions involving barley and wheat and the covered smut pathogen *Ustilago hordei*. *Mol Plant Microbe Interact.* 23(12):1619-34.

Ghosh, P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:771-795.

- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205-227.
- Golstein, P., Aubry, L. und Levrard, J.P.** (2003). Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(10):798-807.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. und Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18:277-284.
- González-Lamothe, R., Tsitsigiannis, D.I., Ludwig, A.A., Panicot, M., Shirasu, K. und Jones JD.** (2006) The U-box protein CMPG1 is required for efficient activation of defense mechanisms triggered by multiple resistance genes in tobacco and tomato. *Plant Cell* 18:1067–1083.
- Grant, M. und Lamb, C.** (2006). Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 414-420.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und D. Hanahan, D.** (1990). Differential Plasmid Rescue From Transgenic Mouse DNAs Into *Escherichia coli* Methylation-Restriction Mutants. *PNAS USA* 87(12): 4645-4549.
- Greenberg, J.T. und Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6: 201-211.
- Grewal, T.S., Rossnagel, B.G., Bakkeren, G. und Scoles, G.J.** (2008). Identification of resistance genes to barley covered smut and mapping of the *Ruh1* gene using *Ustilago hordei* strains with defined avirulence genes. *Can. J. Plant Pathol.* 30: 277–284.
- Gross, A., McDonnell, J.M. und Korsmeyer, S.J.** (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 1899–1911.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. und Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2389-2393.
- Hahn, M. und Mendgen, K.** (2001). Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 322-327
- Han, J.J., Lin, W., Oda, Y., Cui, K.M., Fukuda, H. und He, X.Q.** (2012). The proteasome is responsible for caspase-3-like activity during xylem development. *Plant J.* 72(1):129-41.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557-580.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M. und Nishimura, M.** (2005). Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 404–408.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. und Hara-Nishimura, I.** (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855–858.
- Hauck, P., Thilmony, R. und He, S.Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 100:8577–82

Hawes, M. C. und Smith, L. Y. (1989). Requirement for chemotaxis in pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* on roots of soil-grown pea plants. *J. Bacteriol.* 171: 5668–5671.

Hayward, A.P. und Dinesh-Kumar, S.P. (2011). What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annu Rev Phytopathol.* 49:557-76.

He, C. and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67-93.

He, S.Y., Nomura, K., Whittam, T.S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1694:181-206.

Heath, M.C. (2000) Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol.Biol.* 44, 321–334.

Heil, M. und Baldwin, I.T. (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends Plant Sci.* 7,61–67

Hemetsberger, C. (2012). Das Effektorprotein Pep1 und seine Rolle in der Biotrophie von Brandpilzen. *Dissertation.* Philipps-Universität Marburg.

Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. und Doehlemann, G. (2012). The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. *Plos Pathog.* 8.

Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.

Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. und Ichinose, Y. (2008) Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, 279, 303-312.

Hoefle, C., Loehrer, M., Schaffrath, U., Frank, M., Schultheiss, H. und Hüchelhoven, R. (2009) Transgenic suppression of cell death limits penetration success of the soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi* into epidermal cells of barley. *Phytopathology* 99: 220-226

Hof, A. (2009). Identifizierung von Zelltod-supprimierenden Proteinen in *Ustilago maydis* und *Ustilago hordei*. *Masterarbeit.* Philipps-Universität Marburg.

Hoffman, C.S. und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* 57, 267-272.

Hofius, D, Munch, D., Bressendorff, S., Mundy, J. und Petersen, M. (2011). Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *Cell Death Differ.* 18(8):1257-62.

Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H., Mattsson, O., Jørgensen, L.B., Jones, J.D., Mundy, J. und Petersen, M. (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*. *Cell* 137: 773–783.

- Hogenhout, S.A., van der Hoorn, R.A.L., Terauchi, R. und Kamoun, S.** (2009). Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *MPMI* 22(2): 115–122.
- Holliday, R.** (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair*, 3, 671–682.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W., und Deising, H.B.** (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168 (2011) 51–62
- Horst, R., Doehlemann, G., Wahl, R., Hofmann, J., Schmiedl, A., Kahmann, R., Kämper, J., Sonnewald, U. und Voll, L.** (2010a). *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. *Plant Phys* 152:293-30.
- Horst, R.J., Doehlemann, G., Wahl, R., Hofmann, J., Schmiedl, A., Kahmann, R., Kämper, J. und Voll, L.M.** (2010b). A model of *Ustilago maydis* leaf tumor metabolism. *Plant Signaling & Behavior* 5:11, 1-4
- Hu, G.G., Linning, R. und Bakkeren, G.** (2002). Sporidial mating and infection process of the smut fungus, *Ustilago hordei*, in susceptible barley. *Can. J. Bot.* 80: 1103–1114.
- Hu, G.G., Linning, R. und Bakkeren, G.** (2003). Ultrastructural comparison of a compatible and incompatible interaction triggered by the presence of an avirulence gene during early infection of the smut fungus, *Ustilago hordei*, in barley. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 155-166.
- Huang, J, und Klionsky, D.J.** (2007). Autophagy and human disease. *Cell Cycle* 6:1837–1849.
- Hückelhoven, R.** (2004). BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9: 299–307.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45, 101-127.
- Hückelhoven, R. und Panstruga, R.** (2011). Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Curr Opin Plant Biol* 14:738-746.
- Hückelhoven, R., Dechert, C. und Kogel, K.H.** (2003). Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *PNAS* 100, 5555–5560.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M. und Kogel, K.H.** (2001). Differential expression of putative cell death regulator genes in near- isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 47, 739–748.
- Hung, C.Y, Seshan, K.R., Yu, J.J., Schaller, R., Xue, J., Basrur, V., Gardner, M.J. und Cole, G.T.** (2005) A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect Immun* 73: 6689-703

- Iriti, M. und Faoro, F.** (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant signaling & behavior* 4, 66-68.
- Isbat, M, Zeba, N., Kim, S.Rund Hong C.B..** (2009). A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *J Plant Physiol* 166: 1685–1693.
- Ishikawa, T., Watanabe, N., Nagano, M., Kawai-Yamada, M. und Lam, E.** (2011). Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. *Cell Death Differ.* 18, 1271–1278.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A. und Alfano, J.R.** (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* 37, 554–565.
- Jan, N., Mahboob-ul-Hussain und Andrabi, K.I.** (2008). Programmed cell death or apoptosis: do animals and plants share anything in common. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3, 111–126.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B. und Stebbins, C. E.** (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 Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19: 4004-4014.
- Jones, J.D. und Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Juarez-Montiel, M., Ruiloba de Leon, S., Chavez-Camarillo, G., Hernandez-Rodriguez, C. und Villa-Tanaca, L.** (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Rev Iberoam Micol* 28, 69-73.
- Kabbage, M., Williams, B. und Dickman, M.B.** (2013). Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathog.* 9(4):e1003287.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., und Feldbrügge, M.** (2003) PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *Embo J* 22: 5817-5826.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M. und. Kämper, J** (2000). *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. Fungal Pathology. Kronstad, J.W. (ed.). Kluwer academic publishers. Dodrecht, The Netherlands: 347-371.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., et al.** (2010). External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 142, 284-295.
- Kamoun, S.** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 41-60.

- Kämper, J.** (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics*, 271, 103–110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A.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 Birren, B.** (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 Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* 81(1):73-83.
- Kawai-Yamada, M., Hori, Z., Ogawa, T., Ihara-Ohori, Y., Tamura, K., Nagano, M., Ishikawa, T. und Uchimiya, H.** (2009). Loss of calmodulin binding to Bax inhibitor-1 affects pseudomonas-mediated hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 27998–28003.
- Kawai-Yamada, M., Jin, U., Yoshinaga, K., Hirata, A. und Uchimiya, H.** (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12295–12300.
- Kawai, M., Pan, L., Reed, J.C. und Uchimiya, H.** (1999). Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett* 464: 143–147.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. und Bonas, U.** (2010). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 2007, 318:648-651.
- Kiesling, R.L.** (1952). Histological studies on covered smut of barley. *Ph.D. thesis*, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, Wis. USA
- Kim, H.E., Du, F., Fang, M. und Wang, X.** (2005). Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17545–17550.
- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., Dangl, J.L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6496–6501

- Kim, K.S., Min, J.Y. und Dickman MB.** (2008). Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol Plant Microbe Interact.* 21(5):605-12.
- Klionsky, D.J.** (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118:7–18.
- Klionsky, D.J.** (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:931-37
- Klionsky, D.J. et al.** (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 4(2): 151–175.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A. Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. und Ohsumi Y.** (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5:539–545.
- Koeck, M., Hardham, A.R. und Dodds, P.N.** (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell. Microbiol.* 13, 1849-1857.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., van Loon, L.C. und Pieterse C.M.J.** (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147(3): 1358-1368.
- Kroemer, G. und Levine, B.** (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:1004–10
- Kroemer, G., Galluzzi, L. und Brenner, C.** (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99–163.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Pientini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G.,** (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3–11.
- Lacomme C. und Santa Cruz, S.** (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *PNAS* 96: 7956-7961.
- Lam, E., Kato, N. und Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 484-453.
- Lamb, C. und Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu rev Plant physiol plant mol biol* 48, 251-275.
- Laurie, J. D., Ali, S. Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Guldener, U., Münsterkötter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G. und Schirawski, J.** (2012). Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of TEs. *Plant Cell* 24, 1733-1745
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N. und Iwasaki A.** (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315:

1398–1401.

Leib, K. (2005). Untersuchungen zum Resistenzmechanismus der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber dem Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. hordei). *Dissertation*. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Leist, M. und Jäättelä, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(8):589-598.

Lenz, H.D. (2011). Die Rolle autophagie-assoziiierter Proteine in der pflanzlichen Immunantwort. *Dissertation*. Eberhard Karls Universität. Tübingen.

Lenz, H.D., Haller, E., Melzer, E., Kober, K., Wurster, K., Stahl, M., Bassham D.C., Vierstra, R.D, Parker, J.E., Bautor J, Molina, A., Escudero, V., Shindo, T., van der Hoorn, R.A., Gust, A.A. und Nürnberger, T. (2011). Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant J.* 66(5):818-30.

Levine, B. und Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7:767–777.

Levine, B. und Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463–477.

Levine, B. und Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict. *J Clin Invest* 115:2679–2688.

Li, L., Ishdorj, G., Gibson, S.B. (2012). Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med.* 53(7):1399-410.

Li, L.Y., Luo, X. und Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95–99.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. und Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* 91: 479–489.

Linning, R., Lin, D., Lee, N., Abdennadher, M., Gaudet, D., Thomas, P., Mills, D., Kronstad, J. W. und Bakkeren, G. (2004). Marker-based cloning of the region containing the *UAvr1* avirulence gene from the basidiomycete barley pathogen *Ustilago hordei*. *Genetics* 166: 99 - 111.

Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Talloczy, Z., Levine, B. und Dinesh-Kumar, S.P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121, 567-577.

Lord, C.E.N. und Gunawardena, A.H.L.A.N. (2012). Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *EJCB* 91: 603-613.

Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J. und G. Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death and Differentiation* 6: 516-524.

Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn,

- N.R., Devera, M.E., Liang, X., Tor, M. und Billiar, T.** (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* 220, 60- 81.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., und Ton, J.** (2011). Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *MPMI* Vol. 24, No. 2, 2011, pp. 183–193.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Joseph R. Ecker, J.R. und Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* 112: 379-389.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. und Dangl, J.L.** (2002). RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in Arabidopsis. *Cell* 108: 743–754.
- Maraschin, S. de F., Gaussand, G.I., Pulido, A., Olmedilla, A., Lamers, G.E.M., Korthout, H., Spaink, H.P. und Wang, M.** (2005). Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *Planta* 221: 459–470.
- Martínez-Espinoza, A.D., García-Pedrajas, M.D. und Gold, S.E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet. Biol.* 35(1): 1-20.
- Massey, .A, Kiffin, R. und Cuervo, A.M.** (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2420–2434.
- Mathow, D.** (2011). Transkriptomanalyse von *Ustilago hordei* während der Infektion von Gerste. *Masterarbeit*. Philipps-Universität Marburg.
- Mathre, D.E.** (1997). Compendium of barley diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. USA.
- Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M. et al.** (2003). Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Plant J* 33: 425–434.
- Mehdy, M.C.** (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* 105, 467-472.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. und He, S.Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126:969-980.
- Memelink, J., Verpoorte, R. und Kijne, J.W.** (2001). ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci* 6, 212-219.
- Mendgen, K. und Hahn, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* 7(8): 352-356.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., et al.** (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* 24, 322-335.

- Mitou, G., Budak, H. und Gozuacik, D.** (2009). Techniques to Study Autophagy in Plants. *Int. J. Plant Genomics* 2009.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. und Ohsumi, Y.** (2011). The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. 27:107–32
- Morel, J.B. und Dangl, J.L.** (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Diff* 4, 671-683.
- Morgan, W. und Kamoun, S.** (2007). RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr Opin Microbiol* 10, 332-338.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S. und Uknes, S.** (1998). Induced resistance responses in maize. *Mol Plant Microbe Interact* 11(7): 643-658.
- Moscou, M.J. und Bogdanove, A.J.** (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326:1501.
- Mudgett, M.B.** (2005). New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol* 56:509-531.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. und Doehlemann, G.** (2013). Compatibility in the maize - *Ustilago maydis* interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *Plos Pathog.* 9, 1-13.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A. und de Vries, R.P.** (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Gen. Biol.* 45: 63-70.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. und Ichinose, Y.** (2008). Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1165-1174.
- Neidig, N.** (2013). Funktionelle Analyse des *Ustilago maydis* Effektorproteins Tin3 im Gencluster 19A. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., et al.** (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535):37-43.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F. und Dangl, J.L.** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* 37: 579-609.
- Nürnberg, T. und Brunner, F.** (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.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals, striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249-266.

- O'Connell, R. J. und Panstruga, R.** (2006). Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* 171(4): 699-718.
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests; centenary review. *Journal of Agricultural Science* (2006), 144, 31–43.
- Oerke, E.C. und Dehne, H.W.** (1997) Global crop production and the efficacy of crop protection: Current situation of future trends. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 203-215.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. und Sasakawa, C.** (2005). Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science* 307, 727-731.
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., Bozkurt, T.O., Chaparro-Garcia, A., Segretin, M.E., Stam, R., Schornack, S., Cano, L.M., et al.** (2010). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell Microbiol* 12, 705-715.
- Pandey, S.P. und Somssich, I.E.** (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiol.* 150, 1648-55.
- Panstruga, R. und Dodds, P.N.** (2009). Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* 324, 748-750.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. und Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1–10.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. und Van Wees, S.C.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5, 308-316.
- Piszczek, E. und Gutman, W.** (2007). Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants. *Acta Physiol. Plant.* 29, 391–398.
- Potten, C. und Wilson, J.,** (2004). Apoptosis – The Life and Death of Cells. Cambridge University Press, Cambridge.
- Reape, T.J. und McCabe, P.F.** (2008). Apoptotic-like programmed cell death in plants. *New Phytologist* 180: 13–26.
- Reape, T.J., Molony, E.M. und McCabe, P.F.** (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J. Exp. Bot.* 59(3): 435–444.
- Reed, J.C.** (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387: 773-776.
- Reggiori, F. und Klionsky, D.J.** (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1:11–21.
- Rep, M.** (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiol Lett* 253: 19-27.
- Rodríguez-Serrano, M., Bárány, I., Prem, D., Coronado, M.J., Risueño, M.C. und Testillano, P.S.** (2012). NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J Exp Bot.* 63(5):2007-

24.

Rodriguez, J. und Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13: 3179-3184.

Rojo, E., Martin, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., Jin, H., Paneque, M., Sa, J., Baker, B., Ausubel, F.M. und Raikhel, N.V., (2004). VPE γ exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr. Biol.* 14, 1897–1906.

Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauß, T., Bonas, U. und Lahaye, T. (2007). Plant-pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318:645-648.

Rooney, H.C., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D. und de Wit, P.J. (2005). Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2- dependent disease resistance. *Science* 308, 1783-1786.

Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F. und Martin, G.B. (2007) A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448, 370–374.

Rowell, J.B. und DeVay, J.E. (1954). Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* 44: 356-362.

Rubartelli, A. und Lotze, M.T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trend Immunol* 28, 429-436.

Sambrook, J., Frisch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* 74: 5463-5467.

Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S. et al. (2009). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450: 1253–1257.

Schäfer, P., Pfiffli, S., Voll, L.M., Zajic, D., Chandler, P.M., Waller, F., Scholz, U., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, S., Sonnewald, U. und Kogel, K.H. (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant J.* 59(3):461-74.

Schipper, K. (2009). Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters, das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert. *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg.

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

Scholze H. und Boch J. (2011) TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:47-53

- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990). The b-alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60, 295-306.
- Schulze-Lefert, P.** (2004). Knocking on heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 377-383
- Schulze-Lefert, P. und Panstruga, R.** (2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:641–667.
- Seay, M., Patel, S. und Dinesh-Kumar, S.P.** (2006). Autophagy and plant innate immunity. *Cell. Microbiol.* 8, 899-906.
- Seo, P.J., Lee, A.-K., Xiang, F. und Park, C.-M.** (2008). Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: Insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol.* 49: 334–344.
- Shah, J.** (2009). Plants under attack: systemic signals in defense. *Curr. Opin. In Plant Biol.* 12:459-464
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E. und Innes, R.W.** (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301, 1230–1233.
- Shen, H.M. und Codogno, P.** (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7: 457-465.
- Sidhu, G. und Person, C.** (1971). Genetic control of virulence in *Ustilago hordei*. II. Segregations for higher levels of virulence. *Can. J. Genetics and Cytology* 13:173–178.
- Sidhu, G. und Person, C.** (1972). Genetic control of virulence in *Ustilago hordei*. III. Identification of genes for host resistance and demonstration of gene-for-gene relations. *Can. J. Genetics and Cytology* 14:209–213.
- Skibbe, D.S., Doehlemann, G., Fernandes, J. und Walbot, V.** (2010) Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science*, 328, 89–92.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologica* 84: 193-203.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* 98: 347-355.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trend Cell Biol* 18, 61-67.
- Stergiopoulos, I. und de Wit, P.J.** (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* 47, 233-263.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M. et al.** (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:

441–446.

Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T. und Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 12:209–18

Thomma, B.P., Nürnberger, T. und Joosten, M.H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*. 23(1):4-15.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. und Nicholson, D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 272(29):17907-11.

Torres, M.A., Jones, J.D. und Dangl, J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141, 373-378.

Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W.K. (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3703-3709.

Uren, A.G., Karen O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. und Dixit, V.M. (2000). Identification of Paracaspases and Metacaspases: Two Ancient Families of Caspase-like Proteins, One of which Plays a Key Role in MALT Lymphoma. *Molecular Cell* 6: 961–967.

van den Burg, H.A., Spronk, C.A., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P., Vuister, G.W., de Wit, P.J. und Vervoort, J. (2004). Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *J Biol Chem* 279, 16786-16796.

van der Biezen, E.A. und Jones, J.D.G. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Plant Sci.* 23: 454-456.

van der Hoorn, R.A.L. (2008). Plant Proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 191-223.

van der Hoorn, R.A.L. und Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20, 2009-2017.

van der Hoorn, R.A.L., de Wit, P.J.G.M. und Joosten, M.H.A.J. (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Tr. Plant Sci.* 7, 67-71.

van der Linde, K. (2011). Funktionelle Charakterisierung von Wirtsgenen in der *Ustilago maydis* – Mais-Interaktion. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg.

van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A.L., Kumlehn, J. und Doehlemann, G. (2012). A Maize Cystatin Suppresses Host Immunity by Inhibiting Apoplastic Cysteine Proteases. *Plant Cell* 24, 1285-1300.

van der Linde, K., Kastner, C., Kumlehn, J., Kahmann, R. und Doehlemann, G.

(2011). Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. *New Phytol* 189, 471-483.

van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.* 18, 1241–1246.

van Loon, L.C., Rep, M. und Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135–62.

Vanholme, B., De Meutter, J., Tytgat, T., Van Montagu, M., Coomans, A. und Gheysen, G. (2004). Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332, 13-27.

Vartapetian, A. B., Tuzhikov, A. I., Chichkova, N. V., Taliansky, M. und Wolpert, T. J. (2011). A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death Differ* 18: 1289-1297.

Vaux, D.L. und Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *PNAS* 93: 2239-2244.

Vieira, P., Danchin, E.G.J., Neveu, C., Crozat, C., Jaubert, S. und Hussey, R.S. (2011). The plant apoplast is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. *J. Exp. Bot.* 62, 1241-1253.

Vleeshouwers, V.G., Driesprong, J.D., Kamphuis, L.G., Torto-Alalibo, T., Van't Slot, K.A., Govers, F., Visser, R.G., Jacobsen, E. und Kamoun, S. (2006) Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. *Mol Plant Pathol* 7:499–510.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A. und Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, Vol 49 47: 177-206.

Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J., Sauer, N. (2010). A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* 8: e1000308

Wang, C. und Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Ann. Rev. Genet.* 43, 95–118.

Wang, M., Oppedijk, B.J., Xin Lu, X., Van Duijn, B. und Schilperoort, R.A. (1996). Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 32:1125-1134.

Wang, X., Tang, C., Huang, X., Li, F., Chen, X., Zhang, G., Sun, Y., Han, D., Kang, Z.. (2012). Wheat BAX inhibitor-1 contributes to wheat resistance to *Puccinia striiformis*. *J Exp Bot.* 63(12):4571-4584

Watanabe, N. und Lam, E. (2005). Two Arabidopsis Metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b Are Arginine/Lysine-specific Cysteine Proteases and Activate Apoptosis-like Cell Death in Yeast. *J. Biol. Chem.* 280(15): 14691-14699.

- Watanabe, N. und Lam, E.** (2006). Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J* 45: 884–894.
- Watanabe, N. und Lam, E.** (2009). Bax Inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *Int J Mol Sci* 10: 3149–3167.
- Wawra, S., Agacan, M., Boddey, J.A., Davidson, I., Gachon, C.M., Zanda, M., Grouffaud, S., Whisson, S.C., Birch, P.R., Porter, A.J. et al.** (2012). The avirulence protein 3a (AVR3a) from the potato pathogen *Phytophthora infestans*, forms homodimers through its predicted translocation region and does not specifically bind phospholipids. *J Biol Chem* 287:38101-38109.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., et al.** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450, 115-118.
- Wi, S.G., Singh, A.P., Lee, K.H. und Kim, Y.S.** (2005). The pattern of distribution of pectin, peroxidase and lignin in the middle lamella of secondary xylem fibres in alfalfa (*Medicago sativa*). *Annals of Botany* 95, 863-868.
- Williams, B. und Dickman, M.** (2008). Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol. Plant Pathol.* 9, 531-544.
- Williams, B., Kabbage, M., Kim, H.J., Britt, R. und Dickman MB.** (2011). Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog.* 7(6):e1002107.
- Xiang, T.T., Zong, N., Zhang, J., Chen, J.F., Chen, M.S. und Zhou, J.M.** (2011). BAK1 is not a target of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 100- 107.
- Xiang, T.T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J. und Xing, W.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr. Biol.* 18, 74- 80.
- Xie, Z. und Klionsky, D.J.** (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9:1102–1109.
- Xu, Q. und Reed, J.C.** (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* 1: 337-346.
- Xu, Q., Zhang, L.,** (2009). Plant caspase-like proteases in plant programmed cell death. *Plant Signal. Behav.* 4, 902–904.
- Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejska, K.E., Eissa, N.T.** (2007). Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 27: 135–144.
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., Shirasu, K.** (2011). Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host

cells to modulate plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:14682-14687.

Yorimitsu, T. und Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12:1542–1552.

Zhang, .L, Xu, Q., Xing, D., Gao, C. und Xiong, H. (2009). Real-time detection of caspase-3-like protease activation in vivo using fluorescence resonance energy transfer during plant programmed cell death induced by ultraviolet C overexposure. *Plant Physiol.* 150(4):1773-83.

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

Zimmerman, M., Yurewicz, E. und Patel, G. (1976). A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. *Anal. biochem.* 70, 258-262.

Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 12(4):414-20.

Zipfel, C. und Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 353-360.

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

Zong, N., Xiang, T.T., Zou, Y., Chai, J., und Zhou, J.M. (2008). Blocking and triggering of plant immunity by *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Plant Sig. and Behavior* 3:8, 583-585.

Abgrenzung der Eigenleistung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von mir selbstständig und ohne andere als die hier aufgeführte Hilfe durchgeführt. Dabei erfolgte die Konzipierung der Experimente in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer PD Dr. Gunther Döhlemann.

Im Folgenden werden weitere, an dieser Arbeit beteiligte Personen sowie deren experimentelle Beiträge genannt:

Daniela Aßmann

hat sämtliche PCR-basierten Untersuchungen zur Verifizierung der *U. hordei*-Deletionsmutanten durchgeführt (Abb. 13) und war maßgeblich an der in Abb. 14 dargestellten Quantifizierung der Pilzbesiedelung beteiligt.

Dr. Gunther Döhlemann

hat die in Abb. 19 dargestellten mikroskopischen Aufnahmen zur Auswirkung der *Bl-1*-Überexpression auf die *U. maydis*/Gerste-Interaktion angefertigt, sowie die zugehörigen Daten zur Quantifikation von DAB- und Trypanblau-positiven Zellen erhoben.

Daniel Mathow

hat im Rahmen seiner Masterarbeit, sowie im Anschluss daran, alle hier beschriebenen *Microarray*-basierten Transkriptomanalysen von *U. hordei* durchgeführt.

Daniela Schwambach

hat im Rahmen ihrer Masterarbeit Teile der in Abb. 18 dargestellten Penetrationseffizienz quantifiziert.

Dr. Bernd Zechmann

hat im Rahmen einer Kooperation transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zu kompatiblen und inkompatiblen Interaktionen im *Ustilago*/Gerste-Pathosystem durchgeführt und die in Abb. 24 dargestellten Aufnahmen angefertigt.

Marburg, im Juni 2013

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dennoch möchte ich an dieser Stelle einige Personen hervorheben.

Mein besonderer Dank gilt Gunther Döhlemann für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Bereitstellung dieses spannenden, vielseitigen und fordernden Themas. Zudem bedanke ich mich für die konsequente Unterstützung und die vielen hilfreichen Ideen und die langjährige Begleitung seit der Bachelorarbeit.

Des Weiteren möchte ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Herrn Prof. Dr. Martin Thanbichler danken, Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer insbesondere auch für die Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer für die Begleitung meiner Arbeit im Rahmen des ‚Thesis Advisory Committee‘.

Ein Dank gilt natürlich auch Dr. Bernd Zechmann für die Bereitschaft zur Kooperation, für viele freundliche Telefonate und vor allem für die guten TEM-Aufnahmen.

Ein überaus großer Dank geht an Daniela Aßmann für Expertise, viele Gespräche, das mehr als selbstverständliche Engagement bei der täglich neuen Meisterung aller *hordei*-Hürden und die beste Boxen-Nachbarschaft ever. Danke Dani, es hat viel Spaß gemacht! Gleichzeitig gilt mein Dank natürlich auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Döhlemann, die den Laboralltag zu etwas Besonderem gemacht haben.

Danke natürlich auch an die Mitglieder der AGs Kahmann und Zuccaro, past and present, für viele Hilfestellungen, Gespräche und Unterstützung. Ein besonderer Dank geht hier an Ria, Anita und Stefan, die den Laboralltag um ein Vielfaches erleichtern.

Ein großes Dankeschön geht auch an Daniel Mathow, der nicht nur der beste Masterstudent der Welt war, sondern mir auch ein guter Freund geworden ist! Danke Daniel!

Vielen lieben Dank natürlich auch an Nina Neidig und Nancy Stolle. Danke für die gemeinsame Zeit, die vielen Gespräche, Unterstützung, Durchhaltevermögen und dass wir so gute Freunde geworden sind.

JHO und ‚Con Fuoco‘ danke ich für wöchentliche Ablenkung, Spaß und Ausgleich. Vor allem aber Danke für Eure Freundschaft.

Auch Michi, Tina und Mareike, Danke für Eure Freundschaft.

Bei meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich mich ganz herzlich für die mir zugebrachte Unterstützung bedanken, nicht nur im Rahmen dieser Doktorarbeit. Der größte Dank gilt jedoch meiner Frau Eva und meiner Tochter Marlene. Einfach Danke für alles, für Rückhalt, Motivation, Ausdauer, euer Lachen und eure Liebe. Ich wüsste nicht, was ich ohne euch gemacht hätte!

Lebenslauf

Alexander Hof

geboren am 03. April 1984 in Marburg

SCHULBILDUNG

08/1990 – 07/1994	Grundschule Mornshausen/S
08/1994 – 07/1996	Förderstufe der Freiherr-vom-Stein-Schule/ Europaschule in Gladenbach
08/1996 – 06/2003	Gymnasialzweig der Freiherr-vom-Stein-Schule/ Europaschule in Gladenbach
06/2003	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

ZIVILDIENTST

07/2003 – 06/2004	Der ‚Andere Dienst im Ausland‘ bei Freunde der Erziehungskunst Rudolf Steiners e.V. The Waldorf School of Atlanta Atlanta, GA; USA
-------------------	---

STUDIUM

10/2003 – 09/2007	Bachelorstudium im Studiengang ‚Biology‘ an der Philipps-Universität Marburg
02/2007 – 06/2007	Bachelorarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Organismische Interaktionen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann Titel: „Pep1, ein essentieller Penetrationsfaktor von <i>Ustilago maydis</i> “
10/2007 – 09/2009	Masterstudium im Studiengang ‚Molecular and Cellular Biology‘ an der Philipps-Universität Marburg
10/2008 – 08/2009	Masterarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Organismische Interaktionen in der Arbeitsgruppe von Dr. Gunther Döhlemann Titel: „Identifizierung von Zelltod-supprimierenden Proteinen von <i>Ustilago maydis</i> und <i>Ustilago hordei</i> “

PROMOTION

seit 10/2009	Doktorarbeit an der Philipps-Universität Marburg; durchgeführt am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Organismische Interaktionen in der Arbeitsgruppe von Dr. Gunther Döhlemann Titel: „Die Rolle von programmiertem Zelltod in der epidermalen Resistenz von Gerste“
--------------	--

Mitglied der ‚*International Max Planck Research School*‘
des Max-Planck-Instituts für terrestrische Mikrobiologie

