

Funktionelle Charakterisierung des *Ustilago maydis* Effektorproteins Pit2



Dissertation

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

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

André Nicolai Müller
aus Kaiserslautern

Marburg/Lahn, 2013

Funktionelle Charakterisierung des *Ustilago maydis* Effektorproteins Pit2

Dissertation

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

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

André Nicolai Müller
aus Kaiserslautern

Marburg/Lahn, 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2010 bis November 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: 01.01.2014

Erstgutachter: Herr PD Dr. Gunther Döhlemann
Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2014

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. und Doehlemann, G. (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* **9**: e1003177.

Weitere Veröffentlichungen:

van der Linde, K., Mueller, A.N., Hemetsberger, C., Kashani, F., van der Hoorn, R.A.L., und Doehlemann, G. (2012). The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant Signal Behav* **7**: 1397-1401.

van der Linde, K., Mueller, A.N., Redkar, A., Schilling, L. und Döhlemann, G. (2013). Brandpilze mit Pep: *Ustilago maydis* und das pflanzliche Immunsystem. *BIOspektrum* **19**(2): 140. doi:10.1007/s12268-013-0283-3.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung des *Ustilago maydis* Effektorproteins Pit2“ 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)

(André Müller)

Die Natur ist das einzige Buch, das auf allen Blättern großen Inhalt bietet.

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Zusammenfassung

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrandes, ist ein biotrophes Pflanzenpathogen, das auf lebendes Pflanzengewebe angewiesen ist, um seinen Lebenszyklus zu beenden. Dies erfordert eine effiziente Unterdrückung des pflanzlichen Immunsystems, was durch die Sekretion sogenannter Effektorproteine erzielt wird.

Ein Beispiel für einen solchen Effektor ist Pit2 (*Protein important for tumors 2*, Um01375). *pit2*-Deletionsmutanten können zwar Maispflanzen kolonisieren, sind jedoch nicht mehr dazu fähig, die Entstehung der für diesen Pilz charakteristischen Pflanzentumore zu induzieren. Stattdessen kommt es zu verstärktem Auftreten von Chlorosen in infizierten Pflanzen, was auf eine erhöhte Aktivität pflanzlicher Abwehrmechanismen hindeutet.

Es konnte gezeigt werden, dass Pit2 mit den Abwehr-assoziierten apoplastischen Cysteinproteasen CP1A/B, CP2 und XCP2 interagiert und diese spezifisch inhibiert. Durch Sequenzvergleiche mit Pit2-Orthologen aus verwandten Brandpilzen konnte ein 14 Aminosäuren umfassendes Motiv (PID14) identifiziert werden, welches zur Protease-Interaktion und -Inhibition benötigt wird und zudem essentiell für die Virulenz von *U. maydis* ist. Darüber hinaus können synthetische UmPID14-Peptide apoplastische Maisproteasen inhibieren und die Virulenz der *pit2*-Deletionsmutanten partiell wieder herstellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Pit2 durch Inhibition apoplastischer Cysteinproteasen die pflanzliche Abwehr blockiert und dem Pilz dadurch die Etablierung und Aufrechterhaltung einer biotrophen Interaktion ermöglicht.

Zusätzlich konnte durch Komplementationsversuche gezeigt werden, dass Pit2-Orthologe aus den verwandten Brandpilzen *Ustilago hordei*, *Sporisorium reilianum* oder *Melanopsichium pennsylvanicum* im *U. maydis*-Mais-Pathosystem nicht funktionell sind. Es wurde außerdem gezeigt, dass die orthologen PID14-Regionen innerhalb von UmPit2 die Funktion der UmPID14 *in planta* nicht ersetzen können. Umgekehrt war es jedoch möglich, die Wildtypvirulenz mithilfe von Chimären bestehend aus den orthologen Pit2-Proteinen kombiniert mit der UmPID14-Region teilweise wieder herzustellen. Insgesamt deuten diese Beobachtungen auf eine Wirtsspezifität der verschiedenen Pit2-Orthologe hin, die durch die jeweilige PID14-Region determiniert wird.

Summary

Ustilago maydis, the causative agent of corn smut disease, is a biotrophic plant pathogen that relies on living plant tissue to fulfill its life cycle. This lifestyle requires an efficient suppression of the plant's immune system which is accomplished by the secretion of so-called effector proteins.

One of these effectors is Pit2 (Protein important for tumors 2, Um01375). Deletion mutants for *pit2* are still able to penetrate and colonize host plants but fail to induce tumor formation in infected plants. Instead, chlorosis can be observed at infection sites, indicating that an increased activity of plant defense reactions is elicited. Aim of this thesis was the functional characterization of Pit2.

Yeast-two-hybrid analyses showed that Pit2 interacts with a set of defense-associated apoplastic maize cysteine proteases (CP1A/B, CP2 and XCP2) and inhibits their activity. Sequence comparison with Pit2 orthologs from related smuts identified a conserved 14 amino acid motif (PID14), which is required for protease inhibition and interaction. This domain is essential for virulence of *U. maydis*. Moreover, synthetic UmPID14-peptides are able to inhibit the activity of the tested proteases and expression of PID14 in *U. maydis* SG200 Δ *pit2* partially restores fungal virulence. These results indicate that Pit2 is essential for *U. maydis* to establish and maintain a biotrophic interaction with maize and that this is determined by the inhibition of apoplastic cysteine proteases.

Furthermore it was demonstrated that Pit2 orthologs from the related smuts *Ustilago hordei*, *Sporisorium reilianum* or *Melanopsichium pennsylvanicum* are not functional in the *U. maydis*-maize pathosystem. These findings were further confirmed by showing that the orthologous PID14-regions are not able to replace the function of the UmPID14-region inside UmPit2 *in planta*. In contrast to that, virulence of *U. maydis* SG200 Δ *pit2* was partially restored by chimeric Pit2-versions consisting of any Pit2 ortholog combined with the UmPID14-region. Overall, these observations suggest that the different Pit2 orthologs are host specific and that host specificity is determined by the respective PID14-region.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung
Ad	Gal4-Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
Amp	Ampicillin
Asn	Asparagin
Avr-Protein	Avirulenzprotein
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CatB	CathepsinB
CC9	<i>Corn Cystatin 9</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Clm	Chloramphenicol
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CP	<i>cysteine protease</i>
Cys	Cystein
d	Tag
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DIG	Digoxygenin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dpi	<i>days post infection</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETI	<i>effector triggered immunity</i>
ETS	<i>effector triggered susceptibility</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
<i>g</i>	Fallbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Gent	Gentamicin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
His	Histidin
HR	hypersensitive Reaktion
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
Leu	Leucin
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
LysM	Lysin-Motiv
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mp	<i>Melanopsichium pennsylvanicum</i>
NB-LRR	<i>nucleotide binding leucin rich repeat</i>
nm	Nanometer
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD	optische Dichte
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PID	Protease-Inhibitor-Domäne
Pit	<i>Protein(s) important for tumors</i>
PLCP	<i>Papaine like cysteine protease</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
PRR	<i>pathogen recognition rezeptor</i>
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
Rif	Rifampicin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
R-Protein	Resistenzprotein
RT	Raumtemperatur
SA	<i>salicylic acid</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SP	Signalpeptid
Sr	<i>Sporisorium reilianum</i>
Strep	<i>Streptomyces</i>
Strp	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
Trp	Tryptophan
u. a.	unter anderem
Uh	<i>Ustilago hordei</i>
ün	über Nacht
Um	<i>Ustilago maydis</i>
vgl.	vergleiche
VIGS	<i>Virus-induziertes Gen-silencing</i>
XCP2	<i>xyleme cysteine protease 2</i>
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Infektionsstrategien pflanzenpathogener Pilze	1
1.2 Das pflanzliche Immunsystem	1
1.3 Sekretierte Effektoren in der Pflanzenabwehr	5
1.4 Die Rolle von Cysteinproteasen in der Pflanzenabwehr	6
1.5 <i>Ustilago maydis</i> - Der Erreger des Maisbeulenbrandes.....	9
1.5.1 Sekretierte Effektoren von <i>U. maydis</i>	12
1.5.2 Das <i>pit</i> -Gencluster	13
1.6 Zielsetzung	15
2 Ergebnisse	17
2.1 Pit2 interagiert mit der Mais-Cysteinprotease CP2	17
2.2 Pit2 fungiert als Inhibitor apoplastischer Cysteinproteasen	19
2.2.1 Aufreinigung von Pit2 und CP2	19
2.2.2 Pit2 inhibiert CP2-Aktivität <i>in vitro</i>	20
2.2.3 Pit2 interagiert mit apoplastischen Mais-Cysteinproteasen und inhibiert deren Aktivität	21
2.3 Ein konserviertes Motiv ist essentiell für die Funktion von Pit2.....	25
2.3.1 Sequenzanalyse von Pit2-Orthologen.....	25
2.3.2 Der konservierte Bereich in Pit2 ist essentiell für dessen Funktion	26
2.3.3 Die konservierte Domäne von Pit2 ist essentiell für die Inhibition von Mais-Cysteinproteasen.....	30

2.4 Pit2-Orthologe aus verwandten Brandpilzen sind nicht redundant im <i>U. maydis</i> -Mais-System	35
2.5 PID14 aus Pit2-Orthologen anderer Brandpilze sind in der <i>U. maydis</i> -Mais Interaktion nicht funktionell	37
2.6 Die Aktivität von Pit2 in der <i>U. maydis</i> -Mais-Interaktion wird maßgeblich durch die PID14-Region bestimmt.....	39
2.7 Inhibition von Cysteinproteasen durch PID14-Orthologe	41
2.8 Identifikation von Pit2-ähnlichen Proteinen in Bakterien	44
3 Diskussion	47
3.1 Inhibition apoplastischer Cysteinproteasen durch Pit2	47
3.2 Ein konserviertes Motiv in Pit2 fungiert als Protease-Inhibitor-Domäne	48
3.3 Pit2-Orthologe aus verwandten Brandpilzen können die Funktion von UmPit2 in der <i>U. maydis</i> -Mais Interaktion nicht ersetzen	50
3.4 PID14-Regionen aus Pit2-Orthologen verwandter Brandpilze sind nicht funktionell in UmPit2	52
3.5 Pit2-ähnliche Proteine in Bakterien.....	55
3.6 Die Bedeutung von Pit2 für die Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr.....	57
3.7 Ausblick	60
4 Material und Methoden	62
4.1 Material und Bezugsquellen	62
4.1.1 Chemikalien	62
4.1.2 Puffer und Lösungen.....	62
4.1.3 Enzyme und Antikörper.....	62
4.1.4 Verwendete Kits.....	62
4.2 Zellkultivierung.....	63
4.2.1 Kultivierungs- und Anzuchtmedien.....	63
4.2.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	64
4.2.3 Kultivierung von <i>U. maydis</i>	64

4.2.4 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	64
4.2.5 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen	64
4.3 Verwendete Stämme, Oligonukleotide und Plasmide	65
4.3.1 <i>E. coli</i> -Stämme	65
4.3.2 <i>A. tumefaciens</i> -Stämme	65
4.3.3 <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	65
4.3.4 <i>U. maydis</i> -Stämme	66
4.3.5 Oligonukleotide	66
4.3.6 Plasmide	66
4.3.6.1 Plasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen	66
4.3.6.2 Plasmide zur Generierung von stabilen <i>U. maydis</i> -Mutanten	68
4.3.6.3 Plasmide zur Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	76
4.3.6.4 Plasmide zur transienten Expression von Genen in <i>N. benthamiana</i>	77
4.4 Mikrobiologische Standardmethoden	78
4.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	78
4.4.2 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	79
4.4.3 Transformation von <i>U. maydis</i>	79
4.4.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	80
4.5 Molekularbiologische Methoden	81
4.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren	81
4.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	81
4.5.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i>	81
4.5.2 <i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	82
4.5.2.1 Restriktion von DNA	82
4.5.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten	82
4.5.2.3 Polymerasekettenreaktion	82
4.5.2.4 Gezielte Mutagenese von Nukleinsäuren	83

4.5.2.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren	84
4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	84
4.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	84
4.5.3.2 Southern-Analyse	84
4.6 Biochemische Methoden	87
4.6.1 Auftrennung und Nachweis von Proteinen	87
4.6.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western Blot).....	88
4.6.3 Coomassie-Proteinfärbung.....	89
4.6.4 Silberfärbung.....	89
4.6.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	90
4.6.6 Heterologe Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	90
4.6.7 Aufreinigung von GST-Fusions-Proteinen.....	91
4.6.8 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen	92
4.6.9 Rekonstitution und Aktivierung von CP2	94
4.6.10 Gewinnung von denaturierten Proteinen aus <i>S. cerevisiae</i>	95
4.6.11 Co-Immunopräzipitation	95
4.6.12 Immunopräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe	96
4.6.13 Protease-Aktivitätstests.....	97
4.6.14 Aktivitäts-basierte Markierung von Cysteinproteasen	97
4.7 Pflanzenmethoden.....	98
4.7.1 Maisvarietäten (<i>Zea mays</i> sp.)	98
4.7.2 Kultivierung von <i>Z. mays</i>	98
4.7.3 Infektion von <i>Z. mays</i> mit <i>U. maydis</i>	98
4.7.4 Quantifizierung von <i>U. maydis</i> Infektionen	99
4.7.5 Salicylsäure-Infiltration von Maisblättern.....	99

4.7.6 Isolation und Fraktionierung von apoplastischer Maisflüssigkeit	99
4.7.7 Kultivierung von <i>N. benthamiana</i>	100
4.7.8 Infiltration von <i>N. benthamiana</i> mit <i>A. tumefaciens</i>	100
4.7.9 Isolation von apoplastischer Flüssigkeit aus <i>N. benthamiana</i>	100
4.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung	101
4.9 Bioinformatische Methoden	101
5 Literaturverzeichnis	102
6 Anhang	114

1 Einleitung

1.1 Infektionsstrategien pflanzenpathogener Pilze

Im Laufe der Evolution haben pflanzliche Pathogene verschiedenste Strategien entwickelt, um mit ihren Wirtspflanzen zu interagieren. Eine Möglichkeit der Interaktion zeigen biotrophe Pilze, die auf lebendes pflanzliches Gewebe angewiesen sind, um mit Nährstoffen versorgt zu werden und schließlich ihren Lebenszyklus zu vollenden (Schulze-Lefert und Panstruga, 2003). Biotrophe Interaktionen können auf vielfältige Art und Weise stattfinden und reichen hierbei von Mutualismus, wie etwa im Falle arbuskulärer Mykorrhizapilze bis hin zu Parasitismus, wie es im Falle der Rost- oder Brandpilze beobachtet werden kann (O'Connell und Panstruga, 2006). Besonders wichtig für die Etablierung einer biotrophen Interaktion ist es, das pflanzliche Immunsystem erfolgreich zu unterdrücken, und schließlich eine Umprogrammierung des pflanzlichen Stoffwechsels zugunsten des Pathogens zu erreichen (Schulze-Lefert und Panstruga, 2003; Jones und Dangl, 2006; Dodds und Rathjen, 2010; Doehlemann und Hemetsberger, 2013). Daneben existieren Pilze mit nekrotropher Lebensweise, die das Gewebe infizierter Pflanzen aktiv töten und sich schließlich von totem, pflanzlichem Gewebe ernähren, sich also anschließend saprophytisch ernähren. Ein Beispiel hierfür ist *Botrytis cinerea*, der Erreger der Graufäule (Govrin und Levine, 2000). Zudem gibt es pilzliche Pathogene, die zunächst biotroph leben und im weiteren Verlauf der Pathogenese eine nekrotrophe Lebensweise annehmen. Solche Pathogene werden als hemibiotroph bezeichnet, wobei hier das Bohnenpathogen *Colletotrichum lindemuthianum* oder der Reisbranderreger *Magnaporthe oryzae* als klassische Beispiele genannt werden können (Mendgen und Hahn, 2002).

1.2 Das pflanzliche Immunsystem

Im Gegensatz zu Säugetieren haben Pflanzen keine beweglichen Abwehrzellen und auch kein adaptives, auf Antikörpern beruhendes Immunsystem (Ausubel, 2005; Jones und Dangl, 2006). Sie besitzen ein vielschichtig aufgebautes Immunsystem, um Pathogene zu erkennen und deren Verbreitung im weiteren Verlauf zu unterbinden (Dangl und Jones, 2001; Nimchuk *et al.*, 2003; Chisholm *et al.*, 2006).

Als erste Barriere dienen hierbei präformierte Abwehrmechanismen. Diese werden beispielsweise durch physische Barrieren wie etwa die pflanzliche Zellwand und die wachsartige Cuticula dargestellt, welche nicht nur Pathogenbefall minimieren, sondern die Pflanze auch vor Austrocknung und anderen Umwelteinflüssen schützen sollen (Dangl und Jones, 2001; Hückelhoven, 2007; Koeck *et al.*, 2011). Außerdem bieten unspezifische antimikrobielle Sekundärmetaboliten wie z. B. Saponine, Glucosinolate oder cyanogene Glycoside eine chemische Barriere (Osbourn, 1996).

Zusätzlich zur präformierten Abwehr besitzen Pflanzen eine zweistufige induzierte Abwehr. Hierbei wird die erste Phase der Immunantwort, welche auch als basale oder horizontale Resistenz bezeichnet wird, durch die Erkennung sogenannter MAMPs oder PAMPs (*microbe/pathogen-associated molecular patterns*) vermittelt (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Es handelt sich dabei um hoch konservierte und für ganze Klassen von Pathogenen essentielle Komponenten wie etwa Flagellin, Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) oder Lipopolysaccharide im Falle von Bakterien, sowie Ergosterol, Chitin oder β -Glucan im Falle von Pilzen oder Oomyceten (Jones und Dangl, 2006; Zipfel, 2008; Boller und Felix, 2009; Dodds und Rathjen, 2010). Die Erkennung dieser Strukturen erfolgt mithilfe spezifischer Rezeptoren, sogenannter *pattern recognition receptors* (PRRs). PRRs sind modulare Proteine bestehend aus einer extrazellulären Domäne, welche mithilfe von Leucin-Resten (*leucine rich repeat*, LRR) oder Lysin-Motiven (LysM) verantwortlich für die Signalperzeption ist. Über eine einzelne Transmembrandomäne ist diese mit einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase-Domäne verbunden (Nürnberger *et al.*, 2004; Zipfel und Felix, 2005; Zipfel, 2008; Segonzac und Zipfel, 2011). Eine der ersten Reaktionen nach erfolgreicher Signalperzeption ist die Änderung von Ionenströmen. Insbesondere der rasche Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle spielt hierbei eine wichtige Rolle, da diese eine Funktion als *second messenger* haben und der Aktivierung Calcium-abhängiger Proteinkinasen dienen (Boller, 1995; Nürnberger und Scheel, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2005; Segonzac und Zipfel, 2011). Weitere frühe Reaktionen nach MAMP-Erkennung sind die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die Aktivierung von MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Signalkaskaden und, in diesem Zusammenhang, die Phosphorylierung von Proteinen zur Initiierung früher und später Immunantworten wie z. B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Produktion von

Sekundärmetaboliten (Nühse *et al.*, 2000; Peck *et al.*, 2001; Chinchilla *et al.*, 2007). Im weiteren Verlauf kommt es zur Verstärkung der Zellwände durch Callose-Auflagerungen (Papillitenbildung) und Lignifizierungen, sowie zur transkriptionellen Aktivierung Abwehr-assoziiierter Gene, wie etwa den *PR* (*pathogenesis related*)-Genen oder Genen, die zur Synthese von sekundären Pflanzenstoffen, wie beispielsweise Phytoalexine oder phenolische Substanzen benötigt werden, sowie zur Akkumulation des Phytohormons Salizylsäure (*salicylic acid*, SA) (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Kroj *et al.*, 2003; Conrath *et al.*, 2006; van Loon *et al.*, 2006). Darüber hinaus erkennen Pflanzen auch Fragmente eigener Strukturen, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (Lotze *et al.*, 2007; Boller und Felix, 2009). Diese werden unter anderem typischerweise im Verlauf eines Pathogenbefalls durch Verletzung des pflanzlichen Gewebes, aber auch durch Fressfeinde oder durch abiotische Faktoren wie UV-Strahlung, freigesetzt. Dabei handelt es sich beispielsweise um Zellwand- oder Cutin-Fragmente, deren Erkennung durch die Pflanze ebenfalls eine Immunantwort nach sich zieht (Schweizer *et al.*, 1996; Kauss *et al.*, 1999; D'Ovidio *et al.*, 2004). Die Stimulation von PRRs und damit assoziierte Abwehrmechanismen, die es dem Wirt ermöglichen, Pathogene erfolgreich abzuwehren, wird als *PAMP triggered immunity* (PTI) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006; Dodds und Rathjen, 2010).

Die zweite Stufe der pflanzlichen Abwehr bildet die sogenannte *effector-triggered immunity* (ETI), welche auf der spezifischen Erkennung von Effektorproteinen beruht (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Dabei handelt es sich um Proteine, die im Zuge der Pathogenese in die Wirtspflanze sekretiert werden, mit dem Ziel, das pflanzliche Immunsystem zu modulieren und selbst unerkant zu bleiben. Die Erkennung solcher Proteine kann wiederum durch spezielle Rezeptor-Proteine, sogenannte *nucleotide-binding-LRR* Rezeptoren (NB-LRRs), bewerkstelligt werden (Dangl und Jones, 2001; Chisholm *et al.*, 2006). Wird ein Effektor von dem zugehörigen NB-LRR erkannt, kommt es zu einer Reaktion, die meist stärker und schneller ist, als PTI und häufig in der sogenannten hypersensitiven Reaktion (HR) mündet, was einen programmierten Zelltod darstellt. Hierbei sterben gezielt infizierte Zellen ab, um die weitere Ausbreitung des Pathogens zu verhindern. Erkannte Effektorproteine werden in diesem Zusammenhang als Avirulenz (Avr)-Proteine, ihre zugehörigen Pflanzenproteine als Resistenzproteine (R-Proteine) bezeichnet (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006; Takken *et al.*, 2006; Dodds und

Rathjen, 2010). Dabei muss nicht zwingend, wie nach der Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1971) beschrieben, eine direkte physische Interaktion zwischen R-Protein und korrespondierendem Avr-Protein erfolgen, wie es im Falle des R-Proteins Pi-ta aus Reis (*Oryza sativa*) mit AvrPita aus *M. oryzae* beschrieben wurde (Jia *et al.*, 2000). In vielen Fällen scheint eine indirekte Erkennung stattzufinden. Demnach interagiert der Effektor mit einem Protein, wodurch dieses verändert wird. Diese Veränderung führt dann zur Erkennung durch das R-Protein (Dangl und Jones, 2001). Dieses sogenannte *guard*-Modell kann am Beispiel von RIN4 aus *A. thaliana* verdeutlicht werden. RIN4 bildet zusammen mit den NBB-LRR-Proteinen RPM1 und RPS2 einen Komplex, wobei Degradation von RIN4 durch AvrRpt2 aus *P. syringae* oder Phosphorylierung durch AvrB oder AvrRpm1, ebenfalls aus *P. syringae*, durch RPM1 und RPS2 erkannt wird. Dies führt zur Einleitung pflanzlicher Abwehrmechanismen (Mackey *et al.*, 2002, 2003; Axtell und Staskawicz, 2003). Zielproteine von Effektoren unterliegen einem sehr starken Selektionsdruck, weswegen man nach der neueren *decoy*-Hypothese davon ausgeht, dass im Laufe der Evolution Duplikationen bzw. neue Proteine mit gleicher Funktion entstehen, die das eigentliche Zielprotein nachahmen und als Beute für Effektoren dienen (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Darüber hinaus existiert ein weiteres Modell, das sogenannte *bait-and-switch*-Modell, wonach das NB-LRR-Protein mit einem Effektor-*target* interagiert, was wiederum die direkte Erkennung des Effektors vermitteln soll (Collier und Moffett, 2009). Letztlich entsteht eine Art molekulares "Versteckspiel" zwischen Pflanze und Pathogen, wobei sowohl die Effektoren des Pathogens, als auch die Wirtsproteine einem starken Selektionsdruck unterliegen und somit ständig neue Strategien zur erfolgreichen Infektion bzw. Abwehr entstehen (Birch *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Die grundlegenden Mechanismen der Signalperzeption und -Transduktion im Zusammenhang mit pflanzlicher Abwehr sind noch einmal zusammenfassend in Abb. 1 dargestellt.

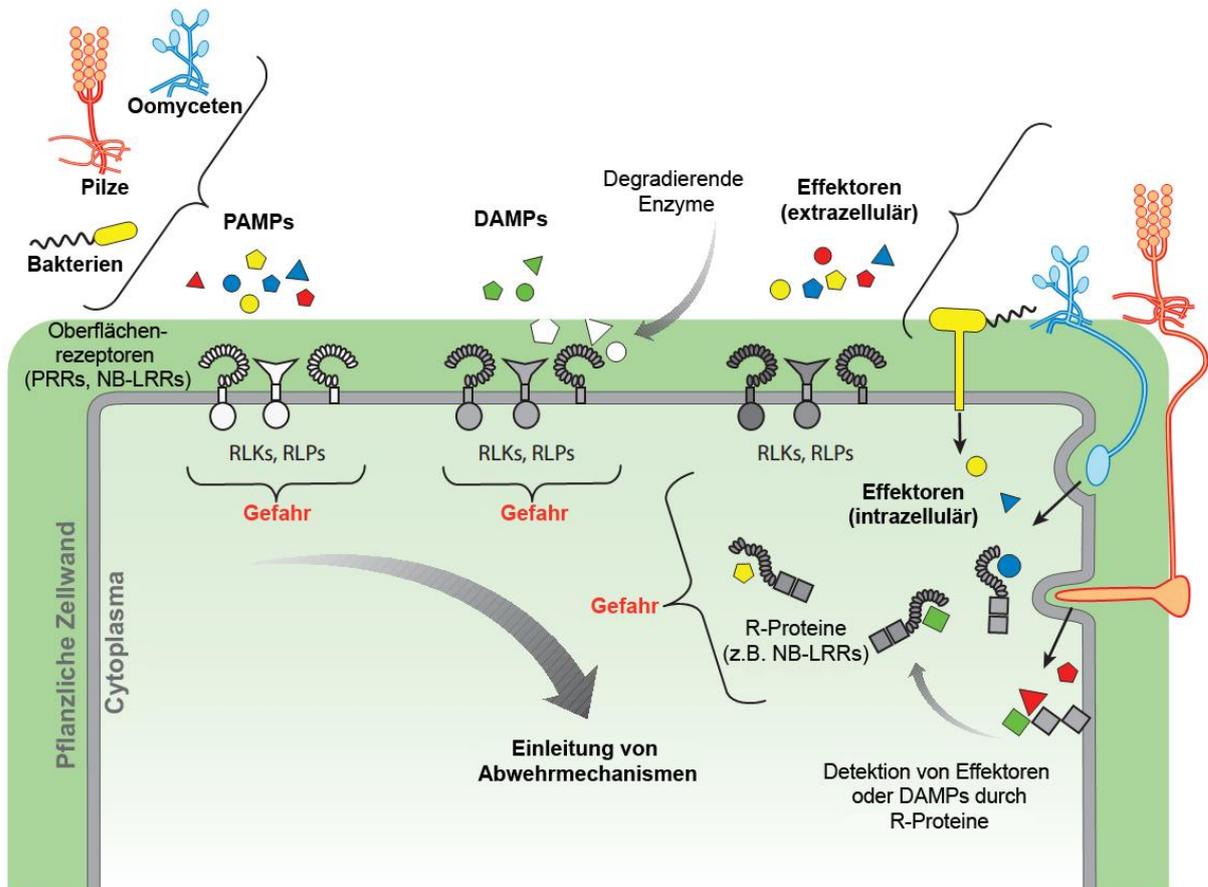


Abb. 1: Schematische Darstellung der Signalperzeption und -Transduktion im Zusammenhang mit pflanzlicher Immunabwehr. Extrazelluläre PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) eindringender Mikroorganismen, sowie im Zuge der Pathogenese durch deren Enzyme freigesetzte DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) werden durch PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt, es kommt zur PTI (*PAMP-triggered immunity*). Durch Coevolution haben erfolgreiche Pathogene Effektoren entwickelt, um dieser Erkennung zu entgehen, wodurch es zu ETS (*effector-triggered susceptibility*) kommt. Pflanzen, auf der anderen Seite, evolvieren neue PRRs und R-Proteine um dies zu umgehen und ETI (*effector-triggered immunity*) zu erreichen. RLK, *receptor-like kinase*; RLP, *receptor-like protein*; NB-LRR, *nucleotide-binding-leucine-rich repeat*. Modifiziert nach Boller und Felix, 2009.

1.3 Sekretierte Effektoren in der Pflanzenabwehr

Um einer frühen Immunantwort der Pflanze zu entgehen und die PTI zu unterdrücken, sekretieren erfolgreiche Pathogene sogenannte Effektormoleküle, die mit einer Vielzahl physiologischer Prozesse der infizierten Wirtspflanze interferieren (Jones und Dangl, 2006; de Wit *et al.*, 2009; Stergiopoulos und de Wit, 2009). Es kommt zur Effektor-vermittelten Suszeptibilität (ETS; *effector-triggered susceptibility*), die die erfolgreiche Besiedelung der Wirtspflanze ermöglicht. Bakterielle Pathogene beispielsweise injizieren zu diesem Zweck Effektorproteine mittels Typ III Sekretionssystem in das Cytoplasma infizierter Pflanzen, wodurch Abwehrmechanismen unterdrückt und die Genexpression entsprechender Zellen manipuliert wird (Hann *et al.*, 2010; Büttner und Bonas, 2010). AvrPto und AvrPtoB

von *Pseudomonas syringae* etwa inhibieren die Kinase-Aktivität der PRRs FLS2 und EFR oder die Bildung des FLS2-BAK1-Komplexes in *Arabidopsis thaliana*. Dadurch wird die eigentlich durch das bakterielle Flagellin ausgelöste Signalweiterleitung unterbunden und somit die PTI unterdrückt (Shan *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2008).

Verglichen mit bakteriellen Effektoren ist über die Wirkungsweise von solchen aus filamentösen Pilzen und Oomyceten bisher sehr wenig bekannt. Dennoch konnte bereits für eine Reihe sekretierter Proteine eine Virulenzfunktion im Zuge der Wirtskolonisierung nachgewiesen werden. Ecp6 beispielsweise, ein Effektor von *Cladosporium fulvum*, der während der Infektion von Tomate (*Solanum lycopersicum*) sekretiert wird, beinhaltet drei LysM-Domänen, die es erlauben, Chitin-Fragmente, die von der pilzlichen Zellwand stammen, zu binden, bevor diese durch PRRs detektiert werden (de Jonge und Thomma, 2009; de Jonge *et al.*, 2010; Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Auch Avr4, ein weiterer Effektor von *C. fulvum*, ist dafür verantwortlich, dass Chitin durch das pflanzliche Immunsystem nicht erkannt werden kann. Im Gegensatz zu Ecp6 bindet Avr4 jedoch direkt an Chitin innerhalb der pilzlichen Zellwand, um dessen Degradation durch pflanzliche Chitinasen zu unterbinden (van den Burg *et al.*, 2004; van Esse *et al.*, 2007).

Neben Bakterien und Pilzen können auch pathogene Nematoden die pflanzliche Abwehr durch die Sekretion von einer Vielzahl von Effektoren mithilfe eines sogenannten Stylets zu modulieren (Bellafiore *et al.*, 2008; Lozano-Torres *et al.*, 2012).

1.4 Die Rolle von Cysteinproteasen in der Pflanzenabwehr

Pflanzliche Genome kodieren in der Regel für mehrere hundert verschiedene Proteasen, die in viele Aspekte pflanzlicher Physiologie und Entwicklung involviert sind. Neben der Degradation beschädigter, fehlgefalteter oder potentiell schädlicher Proteine, nehmen sie wichtige Rollen bei der Regulation vielfältiger biologischer Prozesse ein (Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008). Dazu zählen unter anderem Meiose, Embryogenese, Bildung der Cuticula, Stomata-Entwicklung, Chloroplasten-Biogenese, sowie lokale und systemische Abwehr-Reaktionen (van der Hoorn, 2008). Diese funktionelle Diversität spiegelt sich auch darin wider, dass die Aktivierung von Proteasen einer strikten räumlichen und zeitlichen Regulation unterliegt (van der Hoorn, 2008). Man unterscheidet zwischen Proteasen, die Peptidbindungen innerhalb von Proteinen (Endopeptidasen), an deren N-Terminus

(Aminopeptidasen) oder an deren C-Terminus (Carboxypeptidasen) spalten. Der Mechanismus der Peptidspaltung ist hierbei in allen Fällen identisch. So wird die Carbonylgruppe der Peptidbindung durch Stabilisierung des Sauerstoffatoms in der sogenannten „Oxyanion-Tasche“ polarisiert, was das Kohlenstoffatom anfälliger für den Angriff des aktivierten Nucleophils macht. Je nach Art des dabei verwendeten Nucleophils unterscheidet man zwischen Cystein-, Serin-, Aspartat-, Metallo- und Glutamatproteasen, wobei letztere bisher ausschließlich in filamentösen Pilzen gefunden wurden (Sims *et al.*, 2004; van der Hoorn, 2008). Basierend auf Verwandtschaftsverhältnissen werden Proteasen innerhalb dieser Klassen in verschiedene Familien eingeteilt, die wiederum in Clans unterteilt werden. Die meisten bekannten Proteasen inklusive ihrer zugehörigen Substrate und Inhibitoren sind in der MEROPS-Datenbank des Sanger-Instituts hinterlegt (Rawlings *et al.*, 2011; <http://merops.sanger.ac.uk>). Innerhalb der letzten Jahre stellte sich heraus, dass insbesondere Cysteinproteasen Schlüsselrollen bei der Regulation von Entwicklungsprozessen, sowie im Zusammenhang mit programmiertem Zelltod und in der Immunantwort einnehmen (van der Hoorn, 2008). Verdeutlicht werden kann die Wichtigkeit von Cysteinproteasen für die pflanzliche Abwehr etwa am Beispiel von Papain, welches im Milchsaft der Papaya (*Carica papaya*) in großen Mengen vorzufinden ist (Kimmel und Smith, 1954; Konno *et al.*, 2004). Wird Papain durch das Epoxid E-64, einem spezifischen Cysteinproteaseinhibitor, irreversibel gehemmt, indem dieses kovalent an die Thiolgruppe des Cysteins im aktiven Zentrum bindet, wachsen Larven, die mit auf diese Weise behandelten Blättern gefüttert werden, schneller als solche die mit unbehandelten Blättern gefüttert werden (Hanada, 1978; Matsumoto *et al.*, 1989; Konno *et al.*, 2004). Dies zeigt, dass sich die Hemmung dieser Proteasen unmittelbar auf das Verhältnis zu Fressfeinden auswirkt. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten wurde schließlich eine ganze Gruppe von Proteasen nach ihnen benannt, die sogenannten *Papaine like cysteine proteases* (PLCPs, Protease-Familie C1, Clan CA) (Rawlings *et al.*, 2011). Diese sind in Pflanzen unter anderem an der Pathogenerkennung, der Abwehr-Signaltransduktion, der HR und der Seneszenz beteiligt (van der Hoorn, 2008). Von insgesamt etwa 140 Cysteinproteasen lassen sich im Genom der Modellpflanze *A. thaliana* ungefähr 30 PLCPs finden (Beers *et al.*, 2004). Im Allgemeinen werden diese als inaktive Zymogene synthetisiert, wobei die autoinhibitorische Prodomäne das katalytische Zentrum verdeckt. Diese spielt eine maßgebliche Rolle bei der korrekten Faltung der

Proteine, muss jedoch zur Aktivierung der Proteasen abgespalten werden (Taylor *et al.*, 1995). Da den PLCPs eine wichtige Rolle für das pflanzliche Immunsystem zuzurechnen ist, ist es nicht verwunderlich, dass sie Ziele sekretierter Effektoren darstellen. So sekretiert beispielsweise der Oomycet *Phytophthora infestans* im Zuge der Infektion von Tomate Effektoren, die mit den Cysteinproteasen PIP1 und RCR3 der Pflanze interferieren und somit einen Beitrag zur Virulenz des Pathogens leisten (Tian *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009). Auch Avr2, ein Effektor aus *C. fulvum*, wirkt als Inhibitor dieser beiden Proteasen (Rooney *et al.*, 2005; van Esse *et al.*, 2008). Interessanterweise hat die Inhibition von RCR3 aber keinen Einfluss auf die Virulenz des Pilzes (Dixon *et al.*, 2000). Vielmehr wird der Avr2-RCR3 Komplex durch ein weiteres Protein, Cf-2, erkannt und es kommt zur Induktion von Abwehrmechanismen (Rooney *et al.*, 2005). Zudem kann RCR3 auch durch den von der Nematode *Globodera rostochiensis* sekretierten Effektor VAP1 inhibiert werden, was die unabhängige Entwicklung von Effektoren in phylogenetisch nicht verwandten Organismen verdeutlicht (Lozano-Torres *et al.*, 2012). Auch in Mais wurden bereits mehrere PLCPs identifiziert. Hierzu zählen u. a. Mir1, 2 und 3, wobei die Überexpression von *mir1* eine gehemmte Entwicklung in Insekten hervorruft, wenn sie mit entsprechendem Pflanzenmaterial gefüttert werden (Pechan *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte für die Mais-PLCPs CP1A/B, CP2, XCP2 und Cathepsin B (CatB) eine maßgebliche Rolle bei der Induktion SA-abhängiger Abwehr gezeigt werden. So werden diese einerseits im Zuge des SA-Signalwegs aktiviert und sind andererseits selbst in der Lage, die Expression von *PR*-Genen und Zelltod zu induzieren (van der Linde *et al.*, 2012a). Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese mit dem Mais-Cystatin CC9, dessen Transkription in einer kompatiblen Interaktion mit *U. maydis* induziert wird, interagieren und durch dieses inhibiert werden (van der Linde *et al.*, 2012a, 2012b). Durch Virus-induziertes Gen-*silencing* (VIGS) von *cc9* konnte zudem gezeigt werden, dass die Hemmung apoplastischer PLCPs essentiell für die Besiedelung der Pflanze durch den Pilz ist. So kommt es in Abwesenheit von CC9 zu verstärktem Auftreten Zelltod-assoziiierter Reaktionen, was einerseits in Form verstärkter Abwehrreaktionen gegen *U. maydis* und andererseits durch eine erhöhte Expression Abwehr-assoziiierter Gene in den entsprechenden Pflanzen deutlich wird (van der Linde *et al.*, 2012a).

1.5 *Ustilago maydis* - Der Erreger des Maisbeulenbrandes

Der Basidiomycet *Ustilago maydis* ist ein fakultativ biotrophes Pflanzenpathogen, das innerhalb der Ordnung der Ustilaginales der Familie der Brandpilze (Ustilaginaceae) angehört (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). Die meisten Brandpilze haben ein relativ eingeschränktes Wirtsspektrum und sind spezialisiert auf Pflanzen aus der Familie der Süßgräser (Poaceae), worunter sich auch wichtige Getreidepflanzen wie Mais, Hirse, Zuckerrohr, Weizen und Gerste befinden (Brefort *et al.*, 2009). *U. maydis* ist ausschließlich in der Lage, Mais (*Zea mays*) und dessen mutmaßliche Urform Teosinte (*Zea mays* subsp. *mexicana*, syn. *Euchlena mexicana*) zu infizieren (Christensen, 1963; Doebley, 1992). Er kann dabei alle oberirdischen Organe der Pflanze befallen, wobei als auffälligste Symptome tumorartige Auswüchse beobachtet werden können (Abb. 2). Innerhalb dieser Tumore reifen schwarz pigmentierte Teliosporen heran, die den befallenen Pflanzen ein verbranntes Aussehen verleihen, worauf auch die Namensgebung zurückzuführen ist (*ustilare*, lat. verbrennen).



Abb. 2: Durch *U. maydis*-Infektion hervorgerufene Tumorbildung in Maiskolben.

Im Gegensatz zu vielen anderen Brandpilzen, die weltweit immense wirtschaftliche Schäden verursachen, sind solche die durch *U. maydis* verursacht werden von vergleichsweise geringer Bedeutung (White, 1999). In weiten Teilen von Süd- und Mittelamerika wird der Pilz nicht als Schädling angesehen. Ganz im Gegenteil dazu gelten die ungiftigen Pflanzentumore dort als Delikatesse und wurden bereits zu

Zeiten der Azteken unter dem Namen „Huitlacoche“ zum Verzehr angeboten (Valverde *et al.*, 1995).

Dank seiner einfachen Kultivierbarkeit unter axenischen Bedingungen und der Tatsache, dass der komplette Lebenszyklus auf der Pflanze im Gewächshaus innerhalb von wenigen Wochen nachvollzogen werden kann, hat sich *U. maydis* zu einem exzellenten Modell zur Untersuchung sowohl zellbiologischer, als auch pathogenitätsrelevanter Fragestellungen entwickelt. Des Weiteren trugen auch die Entschlüsselung des kompletten Genoms in Verbindung mit einem effizienten System zur genetischen Manipulation durch homologe Rekombination und die Verfügbarkeit einer Vielzahl biochemischer, sowie zell- und molekularbiologischer Methoden dazu bei (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper, 2004; Kämper *et al.*, 2006; Steinberg und Perez-Martin, 2008).

U. maydis zeigt einen diphasischen Lebenszyklus, wobei haploide Sporidien (Abb. 3A) saprophytisch als hefeartige Zellen wachsen. Die pathogene Form wird durch Bildung eines dikaryotischen Filaments, welches durch die Fusion zweier haploider Sporidien mit kompatiblen Paarungsloci initiiert wird, gebildet (Gillissen *et al.*, 1992). Der biallelische *a*-Locus kodiert für ein Pheromon/Rezeptor-System, was die Erkennung und Fusion von Sporidien mit unterschiedlichen *a*-Loci erlaubt (Bölker *et al.*, 1992). Pheromonperzeption führt zur Ausbildung sogenannter Konjugationshyphen (Abb. 3B), die entlang eines Pheromongradienten aufeinander zu wachsen und an ihren apikalen Spitzen schließlich zu einem dikaryotischen Filament fusionieren (Abb. 3C) (Snetselaar und Mims, 1993; Snetselaar *et al.*, 1996).

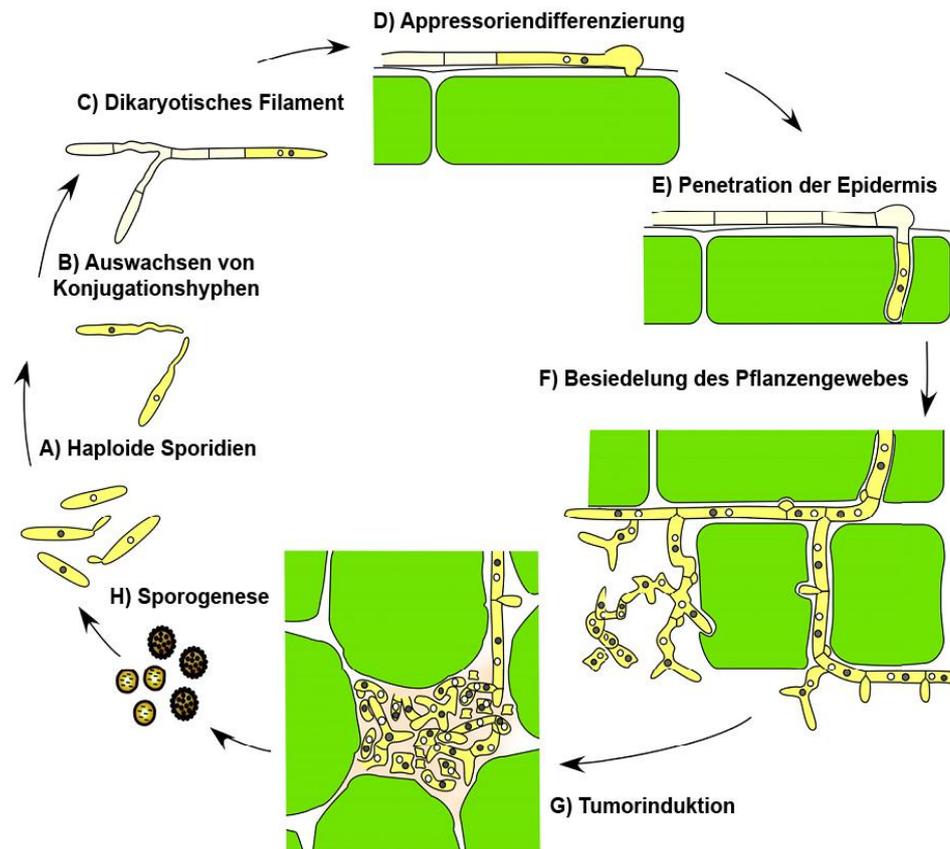


Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*. Der diphasische Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in eine saprophytische (A-C) und eine biotrophe Phase (D-H) unterteilen. Modifiziert nach Kämpfer *et al.*, 2006 und Doehlemann *et al.*, 2008a.

Die Entwicklung des resultierenden Dikaryons wird schließlich durch den multiallelischen *b*-Locus determiniert, welcher für ein Paar von Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren, *bE* und *bW*, kodiert. Wenn diese von unterschiedlichen Allelen zweier Hyphen mit verschiedenen Paarungs-Typ-Loci stammen, kommt es zur Dimerisierung und schließlich zur Bildung des heterodimären *bE/bW*-Komplexes, der sowohl für die Kontrolle von filamentösem Wachstum, als auch der sexuellen und pathogenen Entwicklung verantwortlich ist (Kämpfer *et al.*, 1995; Brachmann *et al.*, 2001). Die dikaryotischen Hyphen zeichnen sich durch Spitzenwachstum aus. Dabei akkumuliert Cytoplasma an der Hyphenspitze, während in älteren Bereichen vermehrt Vakuolenbildung zu beobachten ist und diese schließlich durch Septen räumlich abgetrennt werden (Banuett und Herskowitz, 1994). Durch Hydrophobizität der Pflanzenoberfläche und das Vorhandensein bestimmter Fettsäuren wird schließlich das polare Wachstum eingestellt und es kommt zur Ausbildung eines Appressoriums (Abb. 3D). Dadurch wird dann die Penetration des pflanzlichen Gewebes mit Hilfe lytischer Enzyme ermöglicht (Abb. 3E) (Snetselaar und Mims,

1992; Schirawski *et al.*, 2005; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Die invasive Hyphe wächst anschließend in engem Kontakt zur pflanzlichen Plasmamembran, die dabei invaginiert wird und vollständig intakt bleibt (Snetselaar und Mims, 1993; Doehlemann *et al.*, 2008b). Dadurch entsteht eine sogenannte biotrophe Interaktionszone, die dem Signalaustausch mit der Pflanze und der Aufnahme von Nährstoffen dient (Doehlemann *et al.*, 2008a). Fünf bis sechs Tage nach Infektion kann eine massive Proliferation des pilzlichen Gewebes beobachtet werden (Abb. 3F) und es kommt zur Bildung großer pilzlicher Aggregate in den apoplastischen Zwischenräumen des Tumorgewebes (Abb. 3G) (Banuett und Herskowitz, 1994; Doehlemann *et al.*, 2008b). Anschließend folgt die sogenannte Sporogenese. Hierbei kommt es zur Fragmentierung und Abrundung von Hyphen, die schließlich zu stark melanisierten diploiden Teliosporen differenzieren (Abb. 3H) und nach Aufplatzen der Tumore freigesetzt werden (Snetselaar und Mims, 1993, 1994; Banuett und Herskowitz, 1996). Die Sporen können dann unter geeigneten Bedingungen auskeimen und ein Promyzel bilden. Darin erfolgt schließlich Meiose, es kommt zur Abschnürung haploider Sporidien und der Lebenszyklus kann von Neuem beginnen (Christensen, 1963).

1.5.1 Sekretierte Effektoren von *U. maydis*

Als biotrophes Pathogen ist *U. maydis* auf lebendes Pflanzengewebe angewiesen, was die Unterdrückung des pflanzlichen Immunsystems erfordert. Zu diesem Zweck sekretiert *U. maydis* Effektorproteine in die biotrophe Interaktionszone. Diese sind essentiell für die Etablierung und die Aufrechterhaltung der Biotrophie (Kämper *et al.*, 2006; Doehlemann *et al.*, 2008b, 2011). Für *U. maydis* konnten nach Entschlüsselung des Genoms durch *in silico*-Analysen 554 potentiell sekretierte Proteine identifiziert werden (Mueller *et al.*, 2008). Davon besitzen 168 eine mutmaßlich enzymatische Funktion, während für die restlichen 386 Proteine aufgrund fehlender Homologien zu bereits bekannten Proteinen keine Vorhersagen getroffen werden konnten und ein Großteil dieser spezifisch für *U. maydis* sind (Mueller *et al.*, 2008). Interessanterweise ist die Mehrheit der *U. maydis* Effektoren in Genclustern aus je mindestens drei Genen organisiert. Insgesamt konnten zunächst zwölf solcher Gencluster identifiziert werden, deren Einzeldelationen in fünf Fällen eine starke Veränderung der Virulenz mit sich bringt, die von Hypervirulenz bis hin zu vollständigem Pathogenitätsverlust führt (Kämper *et al.*, 2006). Zusätzlich konnte

durch Transkriptomanalysen von mit *U. maydis* infizierten Maispflanzen gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivierung von Effektoren organspezifisch reguliert wird (Skibbe *et al.*, 2010). So konnte eine unterschiedliche Regulation in verschiedenen Pflanzenorganen (Keimlingsblätter, adulte Blätter und männliche Blüten) gezeigt werden, was darauf schließen lässt, dass durch die Expression unterschiedlicher Effektoren in unterschiedlichen Organen eine Anpassung an die verschiedenen Bedingungen erreicht wird (Skibbe *et al.*, 2010).

Insgesamt ist sehr wenig über die Funktion der einzelnen Effektoren bekannt. Auch die subzelluläre Lokalisation der meisten *U. maydis* Effektoren ist unbekannt. So konnte beispielsweise noch nicht geklärt werden, auf welche Art und Weise Effektoren filamentöser Pilze in das Cytoplasma der Wirtszelle gelangen. Es konnte jedoch kürzlich für die sekretierte Chorismatmutase Cmu1 gezeigt werden, dass diese in das pflanzliche Cytoplasma aufgenommen wird. Dort interferiert sie mit der Synthese von SA. Cmu1 greift aktiv in den Shikimatweg ein und katalysiert die Umwandlung von Chorismat zu Phrephenat, wodurch weniger Chorismat für die Synthese von SA zur Verfügung steht, was sich negativ auf die SA-abhängige Pflanzenabwehr auswirkt. Desweiteren breitet sich Cmu1 über Plasmodesmata in benachbarte Pflanzenzellen aus, was auch in diesen Zellen zur Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr beiträgt (Djamei *et al.*, 2011).

Pep1 (*protein essential during penetration* 1) stellt einen weiteren Effektor dar, dessen Funktion bereits aufgeklärt werden konnte. Deletionsmutanten für *pep1* sind vollständig apathogen; sie scheitern bereits an der initialen Penetration und es kommt zur Erkennung durch die Pflanze. Dies zieht die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, Papillenbildung, sowie lokale Zelltodreaktionen nach sich, was in Form nekrotischer Läsionen auf der Blattoberfläche beobachtet werden kann (Doehlemann *et al.*, 2009). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses im Apoplasten lokalisierte Protein die basale Immunantwort der Pflanze durch die Inhibition einer Mais-Peroxidase (POX12) unterdrückt (Hemetsberger *et al.*, 2012).

1.5.2 Das *pit*-Gencluster

Ein Effektor-Gencluster, das nicht im Zuge der Genomentschlüsselung beschrieben wurde, ist auf Chromosom 2 lokalisiert. Es handelt sich dabei um das *pit* (*protein(s) important for tumors*)-Cluster, bestehend aus den vier *pit*-Genen *pit1-4* (Abb. 4A).

Diese werden, mit Ausnahme von *pit3*, ausschließlich *in planta* exprimiert (Doehlemann *et al.*, 2011).

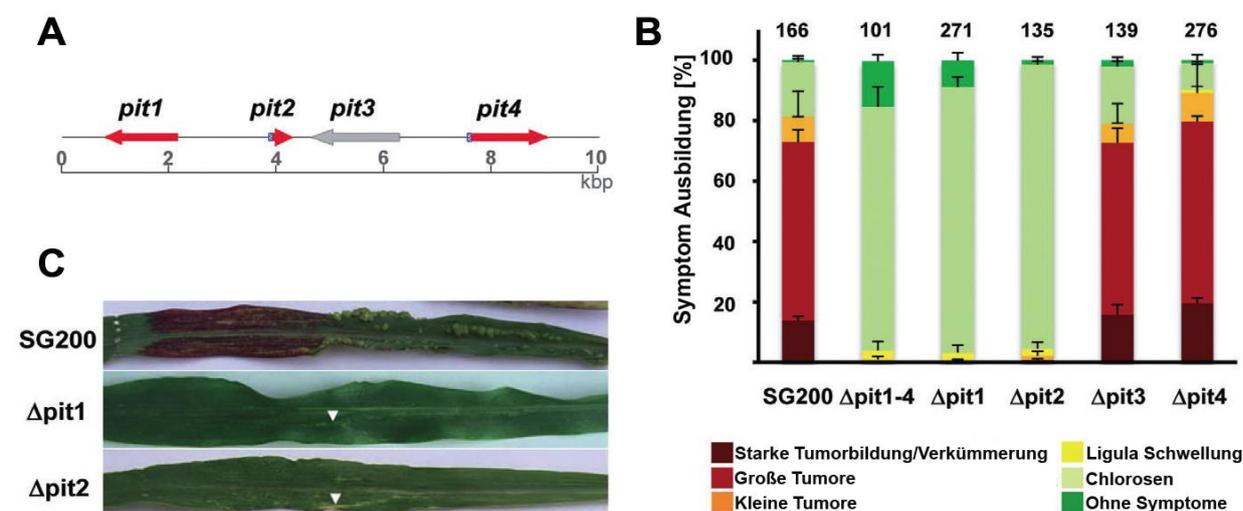


Abb. 4: Das *pit*-Gencluster. **A:** Schematische Darstellung der Gene des *pit*-Genclusters im Genom von *U. maydis*. **B:** Virulenzanalyse verschiedener *pit*-Deletionsmutanten. Im Gegensatz zum solopathogenen Stamm SG200 oder Deletionsmutanten für *pit3* oder *pit4*, zeigen sowohl Mutanten, bei denen das *pit*-Gencluster vollständig deletiert wurde, als auch solche, bei denen entweder *pit1* oder *pit2* deletiert wurde, einen nahezu vollständigen Pathogenitätsverlust. **C:** Während in SG200-infizierten Blättern eine deutliche Tumorinduktion stattfindet, unterbleibt diese vollständig bei mit SG200 Δ pit1/2-Mutanten infizierten Blättern. Modifiziert nach Doehlemann *et al.*, 2011.

pit1 kodiert für ein Membranprotein, während für Pit2 ein Sekretionssignal vorhergesagt wird (Doehlemann *et al.*, 2011). Beide besitzen Orthologe in dem verwandten Brandpilz *Sporisorium reilianum*, es kann jedoch aufgrund fehlender Homologien zu bereits bekannten Proteinen keine Vorhersage über deren Funktion getroffen werden (Doehlemann *et al.*, 2011). Pit3 hingegen zeigt Homologie zu einem Tubulin-spezifischen Chaperon aus Säugetieren, welches dort in Tubulin-Homeostase involviert ist. Pit4 scheint sowohl ein Signalpeptid, als auch Expansin-Domänen zu besitzen (Doehlemann *et al.*, 2011). Die Deletion des kompletten Genclusters, sowie die unabhängige Deletion von jeweils *pit1* oder *pit2* führt zu einem vollständigen Virulenzverlust von *U. maydis* (Abb. 4B/C) (Doehlemann *et al.*, 2011). Die Entstehung von Tumoren in infizierten Pflanzen unterbleibt nahezu vollständig (Abb. 4B/C), stattdessen können chlorotische Flecken in infizierten Bereichen beobachtet werden (Abb. 4B/C), die auf eine aktive pflanzliche Abwehr hindeuten, was auch durch Transkriptomanalysen infizierter Pflanzen anhand der Induktion von Abwehrgenen bestätigt werden konnte (Doehlemann *et al.*, 2011). Die Deletion von *pit3* oder *pit4* jedoch hat keinerlei Auswirkungen auf die Virulenz von *U.*

maydis (Doehlemann *et al.*, 2011). Für Pit1 konnte anhand von GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsproteinen eine Lokalisierung in der Plasmamembran wachsender Hyphenspitzen, sowie in frühen Endosomen und im vakuolären Lumen gezeigt werden. Für Pit2 hingegen konnte unter Verwendung des rot fluoreszierenden mCherry-Fusionsproteins eine Lokalisierung in der biotrophen Interaktionszone beobachtet werden (Doehlemann *et al.*, 2011). Pit2-mCherry akkumuliert um die gesamte Hyphenspitze herum, von wo aus es in Zell-Zell-Übergängen in den apoplastischen Raum diffundiert (Doehlemann *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu *pep1*-Deletionsmutanten sind *pit1/2*-Mutanten weiterhin in der Lage, die basale Immunabwehr der Pflanze zu umgehen, Pit1/2 werden somit nicht zur initialen Etablierung der Biotrophie, sondern vielmehr für deren Aufrechterhaltung benötigt, um es dem Pilz zu ermöglichen, in tiefere Zellschichten vorzudringen (Doehlemann *et al.*, 2011).

Durch eine Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse unter Verwendung von Pit2 als *bait* und einer cDNA-Bank, die auf Grundlage von mit *U. maydis* infiziertem Pflanzenmaterial hergestellt wurde, konnte die Mais-Cysteinprotease CP2 (*Cysteine Protease 2*) als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden (Doehlemann G., Aßmann D, persönliche Mitteilung). Dabei handelt es sich um eine von fünf apoplastischen Cysteinproteasen, die in Verbindung mit der Induktion SA-abhängiger Abwehr stehen und für eine kompatible *U. maydis*-Mais Interaktion inhibiert werden müssen (van der Linde *et al.*, 2012a).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von Pit2 (Um01375). Dabei sollte zunächst die Interaktion von Pit2 mit der apoplastischen Mais-Cysteinprotease CP2 verifiziert werden und im weiteren Verlauf die Interaktion mit den übrigen der durch van der Linde *et al.* (2012a) identifizierten apoplastischen PLCPs (CP1A/B, XCP2 und CatB) getestet werden, da für diese ein Zusammenhang mit der Infektion von Mais durch *U. maydis* gezeigt werden konnte. Dies sollte zunächst mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse geschehen und anschließend durch biochemische Methoden verifiziert werden. Darüber hinaus sollte ein Bezug zur biologischen Relevanz einer potentiellen Interaktion von Pit2 mit apoplastischen Cysteinproteasen für die Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion zwischen Mais und *U. maydis* hergestellt werden. Weitere Ziele stellten die Aufklärung des Mechanismus

der Pit2-Protease-Interaktion auf molekularer Ebene, sowie die Untersuchung orthologer Proteine aus verwandten Brandpilzen im Hinblick auf deren Redundanz im *U. maydis*-Mais-Pathosystem dar.

2 Ergebnisse

2.1 Pit2 interagiert mit der Mais-Cysteinprotease CP2

In Vorarbeiten konnte mittels einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit Pit2 als *bait* und einer cDNA-Bank, die auf Grundlage von mit *U. maydis* infiziertem Pflanzenmaterial hergestellt wurde, die Mais-Cysteinprotease CP2 (*corn cysteine protease 2*) als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden (D. Aßmann und G. Döhlemann). Es handelt sich bei CP2 um eine Protease der C1 Familie (Klan CA). Abb. 5A zeigt eine schematische Darstellung dieser Protease.

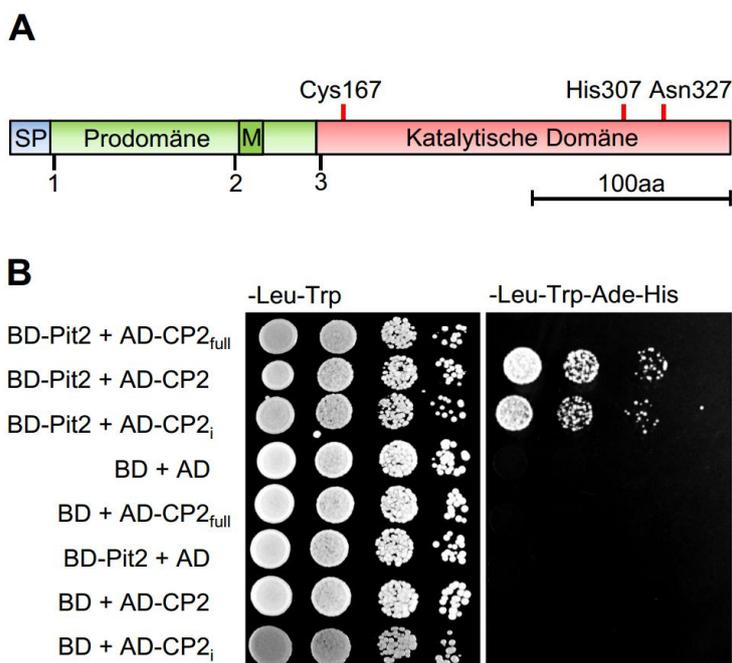


Abb. 5: Interaktion von Pit2 mit der Mais-Protease CP2. **A:** Schematische Darstellung von CP2. Die Aminosäuren Cys167, His307 und Asn327 bilden die katalytische Triade. Die Nummern 1-3 kennzeichnen den Start der für die verschiedenen Experimente verwendeten Konstrukte, 1: Start des Konstruktes für Expression in *E. coli*, 2: Start der Sequenz zur Verwendung in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen, 3: Cp2-Fragment, welches bei der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse unter Verwendung der cDNA-Bank gefunden wurde. SP: Signalpeptid, M: *Minichain*. **B:** Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse zur Untersuchung der Interaktion zwischen Pit2 und verschiedenen CP2-Varianten. CP2_{full}: CP2 inklusive Prodomäne, vgl. 1 aus Abb. 5A; CP2_i: Reste der katalytischen Triade durch Glycin ersetzt; BD: Gal4-Bindedomäne. AD: Gal4-Aktivierungsdomäne.

CP2 enthält ein N-terminales Signalpeptid, das die Sekretion in den Apoplasten ermöglicht. Dahinter befindet sich eine Prodomäne mit einer sogenannten *Minichain*, welche auch nach Abspaltung der Prodomäne weiterhin mit der katalytischen Domäne assoziiert bleibt (Abb. 5A). Um die Interaktion von Pit2 und CP2 zu verifizieren, wurde das *cp2*-Gen ohne den für das Signalpeptid kodierenden Bereich amplifiziert und erneut im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet. Hierbei zeigte sich auf

Selektionsmedium kein Wachstum von Hefe-Kolonien, die eine entsprechende Sequenz für das Volllängenprotein von CP2 (CP2_{full}) enthielten (Abb. 5B). Im Gegensatz dazu konnte unter diesen Bedingungen für Hefen, die eine *cp2*-Version ohne N-terminale Prodomäne exprimierten, bis zu einer Verdünnungsstufe von bis zu 10⁻² Wachstum beobachtet werden (Abb. 5B). Um die Interaktion zwischen Pit2 und CP2 in weiterem Detail zu untersuchen, wurden die Sequenzabschnitte der katalytischen Triade von CP2 (Cys167, His307, Asn327) mit Punktmutationen adressiert und die entsprechenden Basentriplets durch für Glycin kodierende Triplets ersetzt. Hefen, die das resultierende, mutierte *cp2_i* zusammen mit *pit2* exprimierten, waren in gleichem Maße dazu fähig auf Selektionsmedium zu wachsen, wie die, die die native Version von *cp2* exprimierten (Abb. 5B). Dies deutet darauf hin, dass die Proteaseaktivität für die Interaktion der beiden Proteine nicht notwendig ist. Als Negativkontrollen wurden die beiden Leervektoren pGADT7 und pGBKT7, sowie Pit2 beziehungsweise CP2 zusammen mit dem jeweils korrespondierenden Leervektor in den Hefestamm AH109 transformiert. In keinem dieser Fälle konnte Wachstum auf Selektionsmedium beobachtet werden (Abb. 5B), wodurch eine Autoaktivierung des Reportersystems durch Pit2 oder CP2 ausgeschlossen werden kann.

Zusätzlich konnte die Pit2-CP2-Interaktion durch zwei verschiedene Co-Immunopräzipitations (Co-IP)-Experimente verifiziert werden. Hierfür wurde einerseits CP2 aus den Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen als Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne und einem HA-Epitop und andererseits Pit2 als Fusionsprotein mit der Gal4-Bindedomäne und einem cMyc-Epitop gebildet. Dies ermöglichte eine Co-IP von Pit2-cMyc und CP2-HA aus Hefeproteinextrakten mittels Anti-HA-Affinitäts-Matrix und anschließender Detektion von Pit2-cMyc unter Verwendung von anti-c-Myc-Antikörpern per Western Blot (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu konnte kein Signal detektiert werden, wenn Proteinextrakte aus Hefezellen, die entweder Pit2 oder CP2 zusammen mit dem korrespondierenden Leervektor enthielten, verwendet wurden (Abb. 6A). Zusätzlich wurden in *E. coli* hergestelltes GST-Pit2 (siehe Abschnitt 2.2.1) und Blattextrakt von *N. benthamiana*-Pflanzen, die transient CP2-HA exprimierten, für ein Co-IP-Experiment verwendet (in Kooperation mit Sebastian Ziemann). Auch in diesem Fall war es ausschließlich möglich, ein Signal im Western Blot zu detektieren, wenn beide Proteine zusammen inkubiert wurden (Abb. 6B). Zur Kontrolle wurden die beiden Proteine jeweils mit Puffer inkubiert, was in keinem der

beiden Fälle zur Detektion eines Signals führte (Abb. 6B). Somit konnte die direkte Interaktion von Pit2 mit der Cysteinprotease CP2 bestätigt werden.

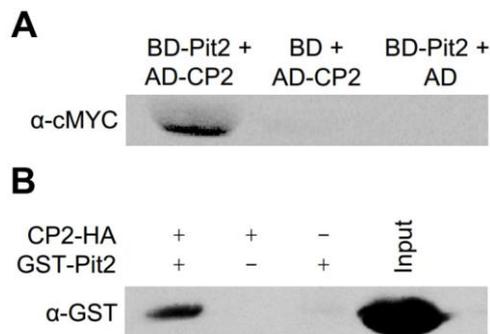


Abb. 6: Pit2 interagiert mit CP2. **A:** Co-Immunopräzipitation von Pit2- und CP2-Fusionsproteinen aus Hefe. **B:** Co-Immunopräzipitation von GST-Pit2 aus *E. coli* und CP2-HA aus *N. benthamiana*.

2.2 Pit2 fungiert als Inhibitor apoplastischer Cysteinproteasen

2.2.1 Aufreinigung von Pit2 und CP2

Als Voraussetzung für *in vitro*-Experimente mit Pit2 und CP2 wurden die beiden Proteine zunächst heterolog in *E. coli* hergestellt und anschließend aufgereinigt. Pit2 wurde dabei als C-terminales Fusionsprotein zu GST hergestellt, der GST-*tag* anschließend mit Hilfe der PreScission[®]-Protease abgespalten und das resultierende Protein per Gelfiltration gereinigt. Abb. 7A zeigt das Resultat einer Aufreinigung.

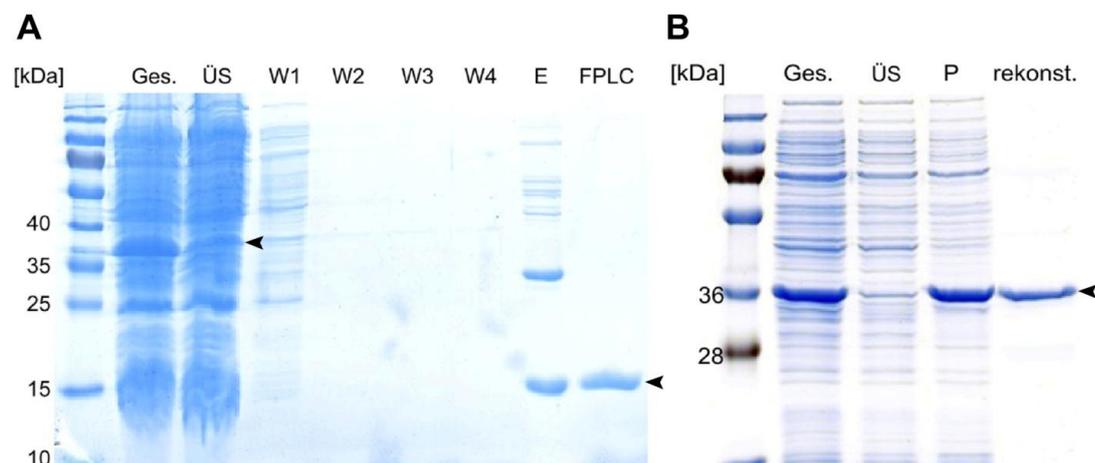


Abb. 7: Heterologe Überexpression und Aufreinigung von Pit2 und CP2. **A:** SDS-PAGE der Aufreinigungsschritte von Pit2. Pit2 wurde als C-terminal zu GST fusioniertes Protein (37,5kDa) heterolog in *E. coli* hergestellt (Ges.). Der lösliche Überstand (ÜS) wurde auf eine GST-Sepharose enthaltende Säule gegeben. Nach einigen Waschsritten (W1-4) wurde Pit2 (11,1kDa) mit Hilfe der PreScission[®]-Protease vom GST-*tag* abgespalten und dadurch von der Säule eluiert (E). Anschließend wurde ein weiterer Reinigungsschritt per Gelfiltration durchgeführt (FPLC). **B:** Heterologe Expression und Aufreinigung von CP2 (38,6kDa). CP2 wurde mit C-terminalem His-*tag* heterolog in *E. coli* hergestellt (Ges.). Die lösliche Fraktion (ÜS) wurde von der Pellet-Fraktion (P) getrennt. Die Pellet-Fraktion wurde unter Einsatz von 6M Guanidin-HCl denaturiert, per Ni-NTA, ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen, aufgereinigt und schließlich rekonstituiert. Zur

Erhöhung des Reinheitsgrades wurde CP2 per Gelfiltration von Unreinheiten getrennt und das erhaltene Protein per SDS-PAGE analysiert (rekonst.).

Während es unter standardisierten Bedingungen keine Schwierigkeit darstellte, große Mengen lösliches Pit2 zu isolieren (Abb. 7A), so war dies für CP2 wesentlich komplizierter. Dieses, als N-terminales Fusionsprotein zu einem Hexahistidin-*tag* hergestellte Protein, konnte unter keiner der getesteten Bedingungen als lösliches Protein im Überstand lysierter *E. coli*-Zellen gefunden werden (Abb. 7B). So wurde getestet, ob durch Verwendung anderer Expressionsstämme und -plasmide sowie durch Variation der Expressionsbedingungen (Temperatur, IPTG-Konzentration) die Löslichkeit des Proteins verbessert werden konnte. Da dies aber nicht möglich war, wurde das Protein aus gereinigten *inclusion bodies* durch initiale Denaturierung und anschließender Rekonstitution unter kontrollierten Bedingungen isoliert und angereichert (Abb. 7B). Vor der Durchführung von *in vitro*-Experimenten wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt noch eine Gelfiltration durchgeführt.

2.2.2 Pit2 inhibiert CP2-Aktivität *in vitro*

Durch *in vitro*-Experimente mit gereinigten Proteinen sollte nun gezeigt werden, ob die Interaktion mit Pit2 einen Einfluss auf die Protease-Aktivität von CP2 hat. Hierzu wurde CP2 zunächst durch Zugabe von 10nM Pepsin und Absenkung des pH-Wertes aktiviert und anschließend die Protease-Aktivität unter Verwendung des fluoreszierenden Substrates Z-Phe-Arg-AMC bestimmt (Abb. 8).

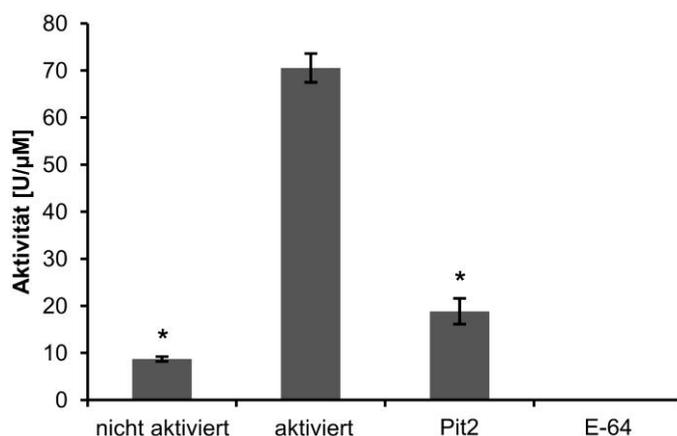


Abb. 8: *In vitro*-Inhibition von CP2 durch Pit2. Die Fluoreszenz-basierte Messung der Proteaseaktivität zeigt die Aktivierung von rekombinatem CP2, sowie dessen Inhibition durch rekombinantes Pit2 und den spezifischen Cysteinprotease-Inhibitor E-64. Die Experimente wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. *, $p \leq 0,05$.

Ohne initiale Aktivierung der Protease, zeigte sich eine basale Aktivität von maximal 10U/ μ M (Abb. 8). Für aktiviertes, rekombinantes CP2 konnte eine Aktivität von etwa 70U/ μ M gemessen werden, die durch Zugabe des spezifischen Cysteinprotease-Inhibitors E-64 vollständig inhibiert werden konnte (Abb. 8). Darüber hinaus führte die Zugabe von 10 μ M Pit2 zu einer signifikanten Verringerung der CP2-Aktivität um etwa 85% auf einen Wert von etwa 20U/ μ M (Abb. 8).

2.2.3 Pit2 interagiert mit apoplastischen Mais-Cysteinproteasen und inhibiert deren Aktivität

CP2 gehört zu einer von fünf apoplastischen Mais-Cysteinproteasen, die im Verlauf eines parallelen Projektes als essentielle Komponenten SA-assoziiierter Pflanzenabwehr identifiziert werden konnten (van der Linde *et al.*, 2012a). In diesem Zusammenhang war es nun interessant zu testen, ob Pit2, neben CP2 auch mit den weiteren SA-Signalweg-assoziierten apoplastischen PLCPs CP1A, CP1B, XCP2 und CathepsinBIII (CatB) interagiert. Zu diesem Zweck wurden die katalytischen Bereiche dieser Proteasen auf Interaktion mit Pit2 im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet. Dabei zeigte sich eine starke Interaktion von Pit2 mit CP1A und CP1B (Abb. 9), zwei Isoformen der Maisprotease CP1, die auf Aminosäureebene innerhalb der Protease-Domäne 95% identische Aminosäurereste aufweisen. Vorhandensein von Pit2 und XCP2 führte zu einem vergleichsweise geringen Wachstum entsprechender Hefen auf Selektionsmedium (Abb. 9), während für eine Kombination aus Pit2 und CatB kein Wachstum beobachtet werden konnte (Abb. 9). Als Kontrolle dienten Hefen, die mit der entsprechenden Protease und mit dem korrespondierenden Leervektor co-transformiert wurden. Auch in diesem Fall zeigte sich bei keiner der getesteten Kombinationen Wachstum auf Selektionsmedium (Abb. 9), wodurch eine Selbstaktivierung des Reportersystems ausgeschlossen werden kann.

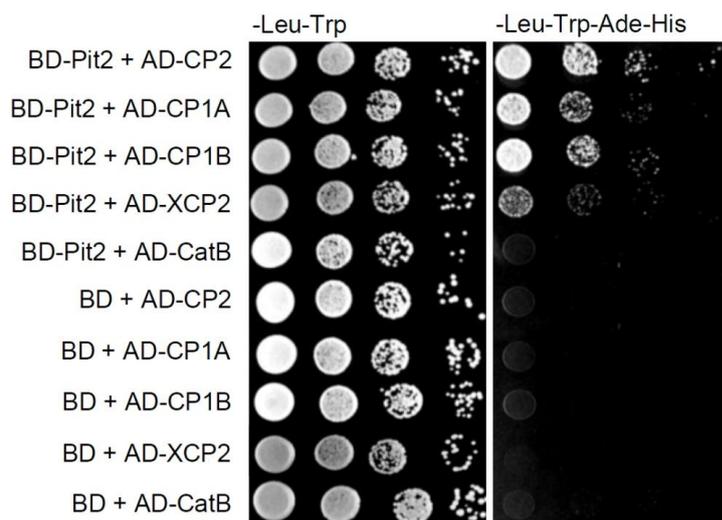


Abb. 9: Interaktion von Pit2 mit den verschiedenen Mais-Poteasen. Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse zeigt eine Interaktion von Pit2 mit den apoplastischen Mais-Cysteinproteasen CP2, CP1A, CP1B und XCP2, jedoch nicht mit CatB. BD: Gal4-Bindedomäne. AD: Gal4-Aktivierungsdomäne.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss von Pit2 auf die Aktivität der apoplastischen PLCPs getestet. Zu diesem Zweck wurde apoplastische Flüssigkeit von SA-behandelten Maispflanzen isoliert, per Ionen-Austauschchromatographie fraktioniert und die Protease-Aktivität in den erhaltenen Fraktionen gemessen, wobei auch in diesem Fall Z-Phe-Arg-AMC als Fluoreszenz-Substrat eingesetzt wurde. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 10 dargestellt.

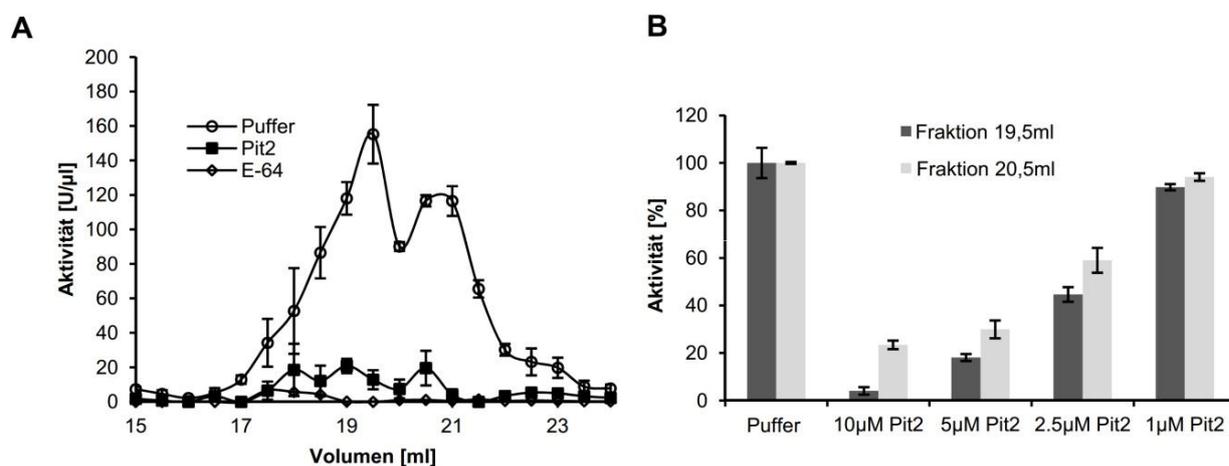


Abb. 10: Inhibition der Aktivität apoplastischer Mais-Proteasen durch Pit2. **A:** Protease-Aktivität in fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit nach SA-Behandlung. Die Protease-Aktivität wird durch Zugabe von 10µM Pit2 oder 5µM E-64 inhibiert. **B:** Konzentrationsabhängige Hemmung der Proteaseaktivität durch Pit2. Die höchste Protease-Aktivität kann bei den Fraktionen für Elutionsvolumen 19,5ml (dunkelgrau) und 20,5ml (hellgrau) beobachtet werden. Zugabe von 1-10µM Pit2 führt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der jeweiligen Protease-Aktivität. Die Experimente wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Hierbei zeigte sich durch Zugabe von 10 μ M rekombinatem Pit2 eine signifikante Hemmung der Proteaseaktivität in den einzelnen Fraktionen mit einer Effizienz von 64,83% (18ml) bis 100% (21,5ml) (Abb. 10A). In einem weiteren Experiment wurde die konzentrationsabhängige Inhibition exemplarischer Fraktionen (19,5ml, 20,5ml) in Anwesenheit verschiedener Pit2-Mengen (10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1 μ M) überprüft (Abb. 10B). Dabei führte die Zugabe von 10 μ M Pit2 dazu, dass noch etwa 4% (19,5ml) bzw. 23% (20,5ml) der in der Pufferkontrolle gemessenen Aktivität verzeichnet werden konnte, während nach Zugabe von 1 μ M eine Aktivität von 89% (19,5ml) bzw. 94% (20,5ml) beobachtet wurde (Abb. 10B). Die Auffälligkeit, dass Fraktion für Elutionsvolumen 19,5ml durch Zugabe von Pit2 nahezu vollständig gehemmt werden konnte (Abb. 10B), Fraktion für Elutionsvolumen 20,5ml jedoch nicht (Abb. 10B), deutet auf eine spezifische Inhibition apoplastischer PLCPs durch diesen Effektor hin. Zusätzlich konnte die Protease-Inhibition dieser beiden Fraktionen durch Aktivitäts-basierte Markierung von Cysteinproteasen mithilfe der Cysteinprotease-spezifischen Sonde DCG-04 (Greenbaum *et al.*, 2000) bestätigt werden (Abb. 11). Dabei handelt es sich um ein biotinyliertes Derivat des spezifischen Cysteinprotease-Inhibitors E-64, der kovalent am Cysteinrest des aktiven Zentrums von Cysteinproteasen bindet. Der Biotinrest ermöglicht schließlich die Detektion von Cysteinproteasen mittels Western Blot. Ist das aktive Zentrum jedoch blockiert, können entsprechende Proteasen nicht markiert und folglich nicht detektiert werden. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, konnte in Anwesenheit von Pit2, ebenso wie in Anwesenheit von E-64, keine Markierung von Cysteinproteasen verzeichnet werden.

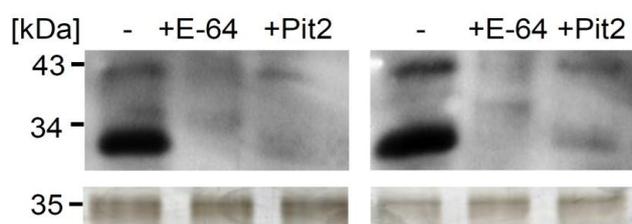


Abb. 11: Aktivitäts-basierte Markierung von Cysteinproteasen. Die Markierung von Cysteinproteasen in den Fraktionen für Elutions-Volumen 19,5ml (links) und 20,5ml (rechts) unterbleibt in Anwesenheit von 10 μ M Pit2 oder 5 μ M E-64. Die jeweils darunter abgebildete Ladekontrolle zeigt eine gleichmäßige Beladung aller Spuren.

Die beobachtete Inhibition der Proteasen könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass Pit2 als Substrat für die getesteten Proteasen dient. Daher wurde jeweils die Probe eines Aktivitätstests von Pit2, sowie der im weiteren Verlauf dieser Arbeit

verwendeten Variante Pit2^{mut49-53} (siehe Abschnitt 2.3.3) mit Fraktion 19,5ml nach Auftrennung per SDS-PAGE und einer anschließenden Silberfärbung analysiert. Hierbei zeigte sich keinerlei Degradation der eingesetzten Proteine (Abb. 12).

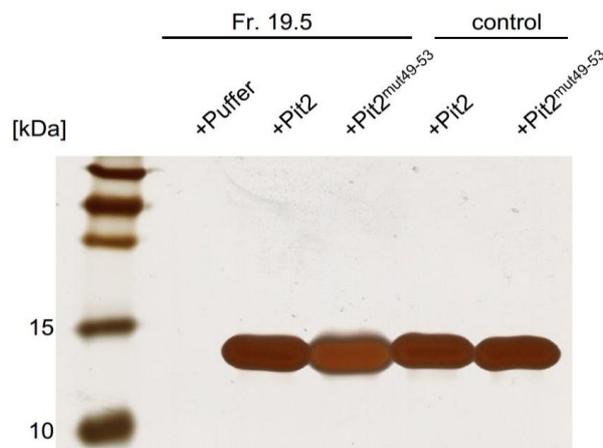


Abb. 12: Stabilität von Pit2 und Pit2^{mut49-53} in Anwesenheit apoplastischer Proteasen. Silbergefärbtes SDS-Gel von Pit2 und Pit2^{mut49-53}, was mit Fraktion für Elutionsvolumen 19,5ml inkubiert wurde. Zur Kontrolle wurden gleiche Proteinmengen mit dem entsprechenden Reaktionspuffer inkubiert.

Um die Interaktion von Pit2 mit den apoplastischen Cysteinproteasen detaillierter zu untersuchen, wurden im Rahmen der Masterarbeit von Sebastian Ziemann CP1A, CP2, XCP2 und CatB durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation heterolog in *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Ihre Aktivität, sowie der Einfluss von Pit2 auf diese, wurden unter Einsatz von Z-Phe-Arg-AMC als Fluoreszenz-Substrat bestimmt (Abb. 13).

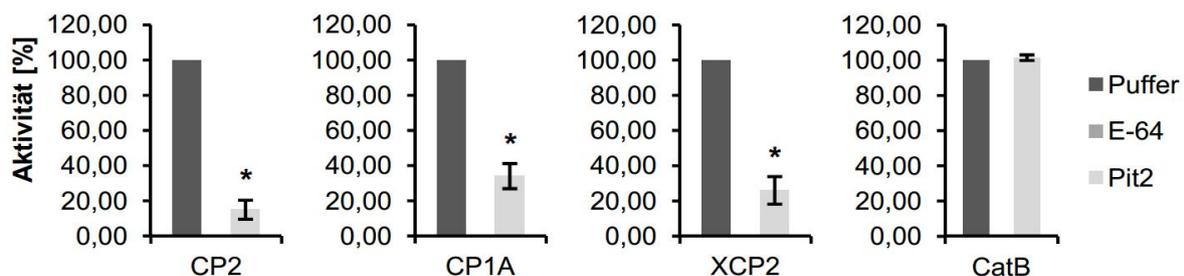


Abb. 13: Aktivität von transient in *N. benthamiana* hergestellten Proteasen und deren Hemmung durch Pit2. Die Protease-Aktivität der Proteasen CP1A, CP2, XCP2 und CatB wird durch Zugabe von 5µM E-64 vollständig inhibiert, während die Zugabe von 10µM Pit2 nur zu einer signifikanten Hemmung von CP1A, CP2 und XCP2 führt, nicht jedoch von CatB. Die Experimente wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. *, $p \leq 0,05$.

Wie in Abb. 13 dargestellt, konnte die Aktivität aller getesteten Proteasen durch Zugabe von 5µM E-64 vollständig inhibiert werden, was auf die Spezifität der gemessenen Protease-Aktivität hindeutet. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 10µM Pit2 zwar zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität von CP1A, CP2 und

XCP2 auf ca. 20% (CP2) bzw. 30% (CP1A, XCP2) der Ausgangsaktivität (Abb. 13), keineswegs jedoch zur Inhibition von CatB-Aktivität (Abb. 13). Hier konnte auch in Anwesenheit von Pit2 noch eine vollständige Protease-Aktivität verzeichnet werden.

2.3 Ein konserviertes Motiv ist essentiell für die Funktion von Pit2

2.3.1 Sequenzanalyse von Pit2-Orthologen

Die Sequenzierung der Genome der mit *U. maydis* verwandten Brandpilzarten *Sporisorium reilianum*, dem Erreger des Maiskopfbrandes, sowie von *Ustilago hordei*, dem Erreger des Gerstenhartbrandes (Schirawski *et al.*, 2010; Laurie *et al.*, 2012), ermöglichte die Identifikation von Genen, die eine signifikante Ähnlichkeit zu *pit2* aus *U. maydis* aufweisen. Des Weiteren wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Marco Thines (Goethe-Universität Frankfurt) eine Sequenz aus *Melanopsichium pennsylvanicum* zur Verfügung gestellt, die ebenfalls eine signifikante Ähnlichkeit zu *U. maydis pit2* zeigt. Insgesamt zeigen die daraus resultierenden Proteine mit 28% (Uh02064), 33% (Sr10529) und 30% (Mp4_3204) einen geringen Anteil identischer Aminosäuren im Vergleich zu Pit2 aus *U. maydis*. Dennoch ist innerhalb dieser vier Sequenzen ein Abschnitt enthalten, der stark konserviert ist (Abb. 14). Dieser aus 14 Aminosäuren bestehende Bereich beinhaltet eine Abfolge von fünf Aminosäuren, die überwiegend aromatische Reste besitzen (Abb. 14).

Um01375	1	MLFRSAFVLLIVAFASACLVOH-----VQAI P-VRRSLST
Uh02064	1	MLHYLGRLFLVAALAVACL RPA-----TONRP-LRRAIVG
Sr10529	1	MLVHSA--RAFVAALLLGLVLH-----VHAMPAMRRSLSS
Mp4_3204	1	MWQ-SGRLIILAAALAAACLLOHAQAGRIQAVP---RAVAD
Um01375	35	DASMSSAAG---KLNRRWWFGFTGSLGKEPDNGQVQIKI
Uh02064	34	D-NNDNYIT---KLHRRWYFLWPGSLAPKPPREGEEHKI
Sr10529	35	HADAGAAGGSTLGKLAARRWFFDFGGALSRW---DVAPILR
Mp4_3204	37	DSASDRAS-----KLSRRWMFGWDGSLSPAPKYSPTKIHI
Um01375	71	IPDALI IKNPPANKDDLNKLIENLKRKHPRFKTVVMPTDP
Uh02064	71	IYADWIVHHDPAYN SNVQKEI ELARLQNPTFIQVSVGESS
Sr10529	70	IPEDVAKAHSRAEVARWEVYLERVHREHPDWQYVHW-TD-
Mp4_3204	72	IAPDFLRDNRPATDSEAQRELDRLAKRQAQIFWVTF SQ--
Um01375	111	NGDVVIWE---
Uh02064	109	SSSSSSSSKKS
Sr10529	110	NGPIGYKSH--
Mp4_3204		-----

Abb. 14: Konservierung von Pit2 in verwandten Brandpilzen. Vergleich der Aminosäuresequenzen von *U. maydis* Pit2 mit Orthologen aus *U. hordei* (Uh02064), *S. reilianum* (Sr10529) und *M. pennsylvanicum* (Mp4_3204). Rot umrahmte Bereiche stellen das durch SignalP4.0 vorhergesagte Signalpeptid dar. Der orange umrahmte Bereich kennzeichnet einen 14 Aminosäuren umfassenden, konservierten Bereich. Der grün umrahmte Bereich entspricht einem, überwiegend aus aromatischen Aminosäuren bestehenden Bereich.

2.3.2 Der konservierte Bereich in Pit2 ist essentiell für dessen Funktion

Um zu untersuchen, ob der konservierte Sequenzabschnitt für die Funktion als Effektor relevant ist, wurden verschiedene Mutationen in *U. maydis pit2* eingefügt. In *pit2*^{Δ44-57} wurde die für den konservierten Bereich kodierende Region vollständig deletiert, während in *pit2*^{Δ49-53} lediglich die für die fünf zentralen Aminosäuren kodierende Region deletiert wurde (Tab. 1). Im Falle von *pit2*^{mut49-53} wurden die entsprechenden Basentriplets durch Punktmutationen verändert und durch solche ersetzt, die für Glycin bzw. Alanin kodieren (Tab. 1).

Tab. 1: Das in Pit2 konservierte Motiv und die in dieser Arbeit verwendeten Varianten.

Name	Sequenz (Pit2 Aminosäuren 41-60)
Pit2	AAGKLNRRWWFGFTGSLGKE
Pit2 ^{Δ44-57}	AAG-----GKE
Pit2 ^{Δ49-53}	AAGKLNRR-----TGSLGKE
Pit2 ^{mut49-53}	AAGKLNRRGGAGGTGSLGKE

Die daraus resultierenden Pit2-Versionen wurden zunächst im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf Interaktion mit den Mais-Proteasen CP1A, CP1B, CP2, XCP2 und CatB getestet (Abb. 15).

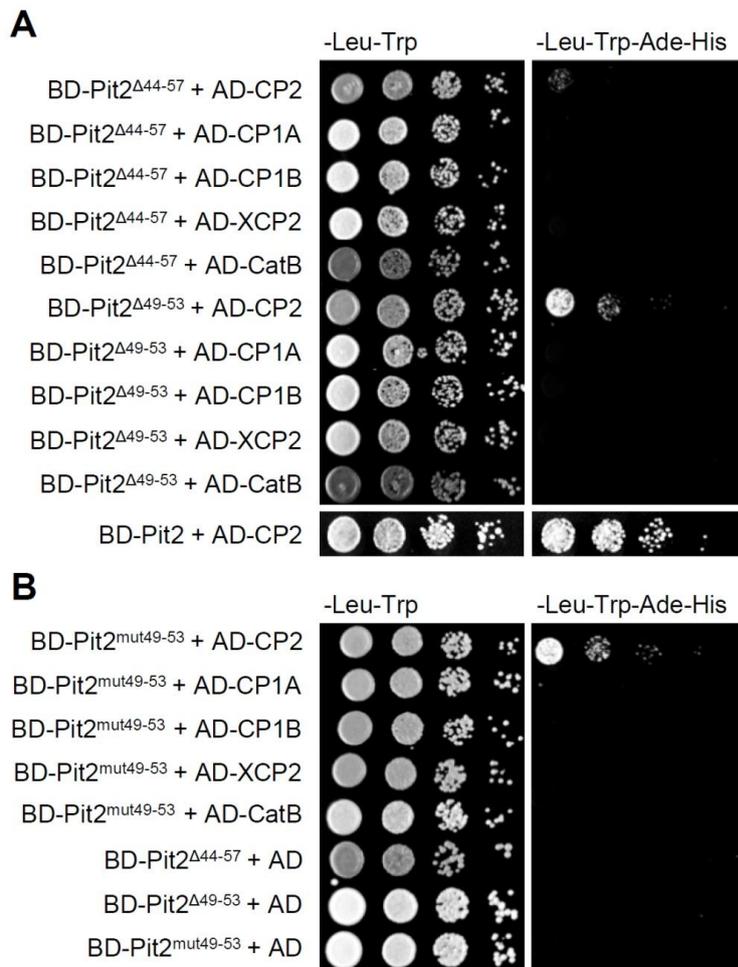


Abb. 15: Die Rolle des in Pit2 konservierten Bereichs für die Interaktion mit Mais-Proteasen. A: Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse von Pit2-Varianten, bei denen der konservierte Bereich (Abb. 14) deletiert wurde (siehe auch Tab. 1). **B:** Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse von Pit2 mit mutierter konservierter Domäne (siehe auch Tab. 1). BD: Gal4-Bindedomäne. AD: Gal4-Aktivierungsdomäne.

Für keine der veränderten Pit2-Varianten (Pit2^{Δ44-57}, Pit2^{Δ49-53} oder Pit2^{mut49-53}) konnte eine Interaktion mit CP1A, CP1B, XCP2 oder CatB beobachtet werden (Abb. 15). Für die Kombination aus CP2 mit Pit2^{Δ49-53} oder Pit2^{mut49-53} hingegen zeigte sich eine ähnlich starke Interaktion wie es für die native Pit2-Variante beobachtet wurde (Abb. 15), wohingegen Pit2^{Δ44-57} mit CP2 lediglich eine geringe Interaktion aufwies (Abb. 15).

Von entscheidender Bedeutung für die Relevanz der konservierten Region ist, ob die Interaktion mit den getesteten PLCPs mit der Virulenzfunktion von *U. maydis* korreliert. Daher wurden *pit2*^{Δ44-57} und *pit2*^{mut49-53} in der *U. maydis pit2*-Deletionsmutante unter Kontrolle des nativen *pit2*-Promotors exprimiert. Die resultierenden Stämme SG200Δ*pit2*-*pit2*^{Δ44-57} und SG200Δ*pit2*-*pit2*^{mut49-53} wurden für Infektionstests mit 7 Tage alten Mais-Keimlingen verwendet (Abb. 16). Als Positiv-

Kontrolle diente ein Stamm, der mit dem Wildtyp *pit2*-Gen aus *U. maydis* komplementiert wurde (SG200 Δ pit2-pit2, Doehlemann *et al.*, 2011).

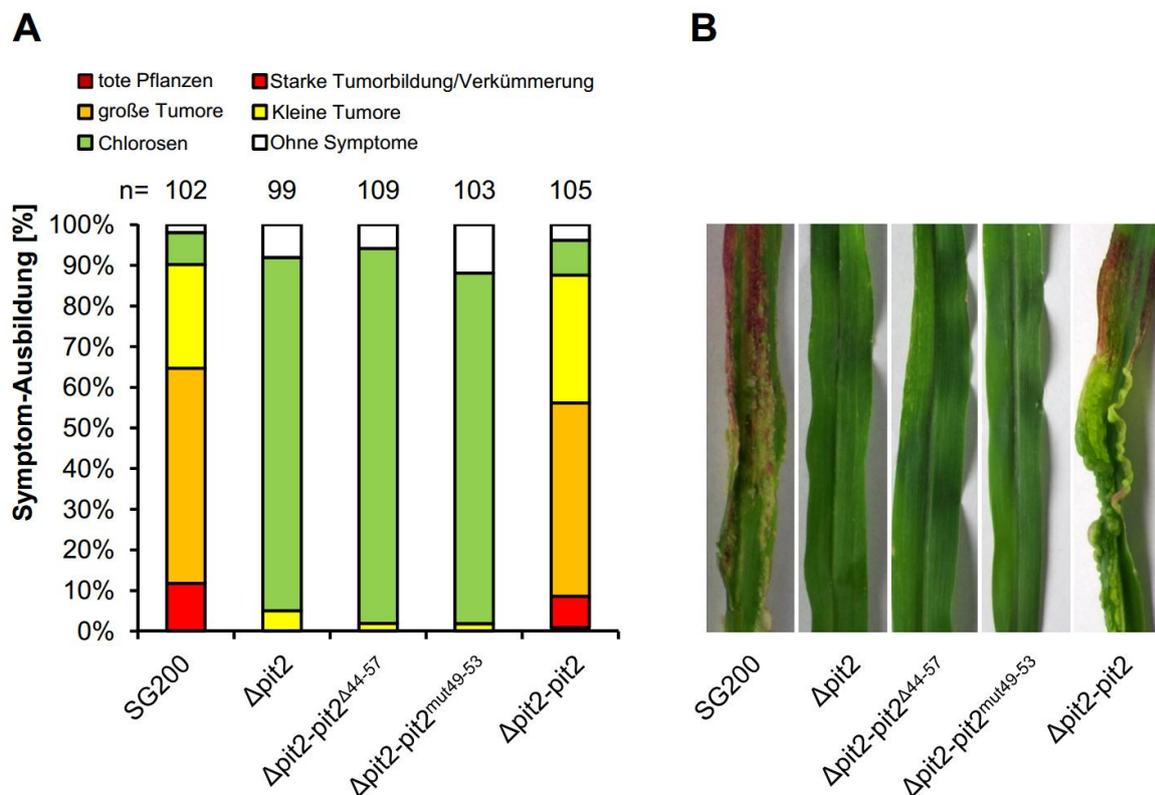


Abb. 16: Das konservierte Motiv in Pit2 wird für die Virulenz von *U. maydis* benötigt. **A:** Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen, 12 Tage nach Infektion (dpi, days post infection) mit *U. maydis*. SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δ pit2: SG200 Δ pit2, *pit2*-Deletionsmutante. SG200 Δ pit2-pit2 Δ 44-57: SG200 Δ pit2 komplementiert mit *pit2* Δ 44-57 (siehe auch Abb. 14 und Tab. 1). SG200 Δ pit2-pit2^{mut49-53}: SG200 Δ pit2 komplementiert mit *pit2*^{mut49-53} (siehe auch Abb. 14 und Tab. 1). SG200 Δ pit2-pit2: SG200 Δ pit2 komplementiert mit *pit2* (Doehlemann *et al.*, 2011). **B:** Infektionssymptome ausgelöst durch die in (A) beschriebenen Stämme.

Weder die Infektion mit SG200 Δ pit2-pit2 Δ 44-57, noch die Infektion mit SG200 Δ pit2-pit2^{mut49-53} führte zur Entstehung von Tumoren auf infizierten Pflanzen (Abb. 16A, B). In beiden Fällen zeigten sich lediglich Chlorosen, die sich nicht von solchen, die auch im Falle von SG200 Δ pit2-Infektionen entstehen, unterschieden (Abb. 16A, B). Dagegen führte die Expression des nativen *pit2*-Gens zur vollständigen Komplementation des SG200 Δ pit2-Phänotyps (Abb. 16A, B).

Zur Untersuchung der Sekretion und Lokalisation der verwendeten, mutierten Pit2-Varianten, wurden *U. maydis*-Mutanten hergestellt, die Pit2 Δ 44-57 bzw. Pit2^{mut49-53} als N-terminale Fusion zu mCherry produzieren. Dies ermöglichte die Visualisierung dieser Proteine in infizierten Maiskeimlingen mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes (Abb. 17).

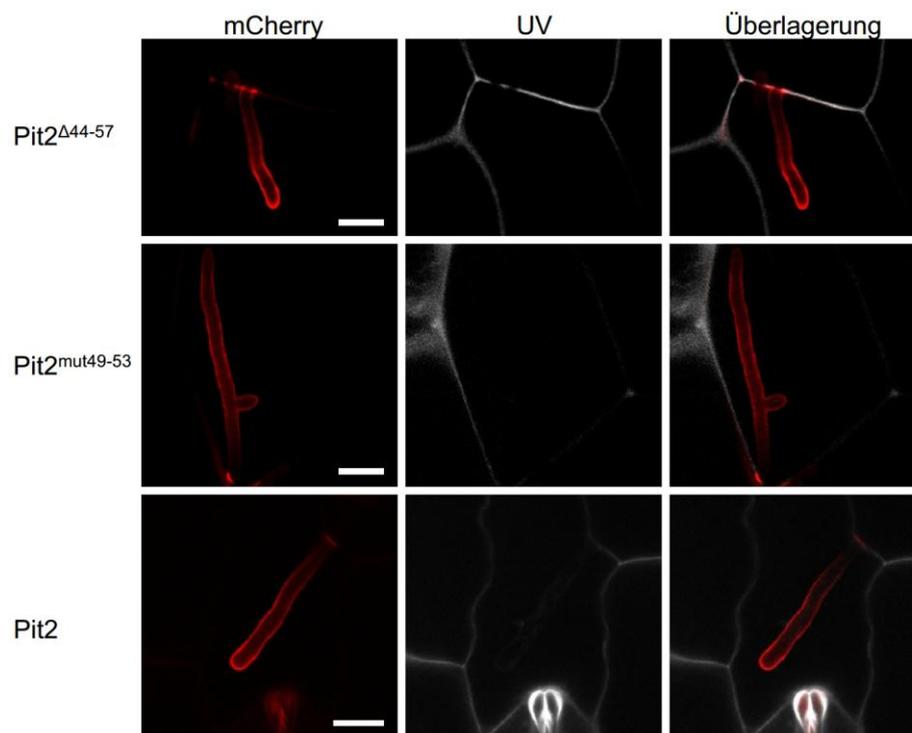


Abb. 17: Lokalisation von verschiedenen Pit2-Varianten. Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die Sekretion von Pit2^{Δ44-57}-mCherry (Oben), Pit2^{mut49-53}-mCherry (Mitte) und Pit2-mCherry (Unten) zeigen. Rot: mCherry-Signal. Grau: Durch UV-Laser induzierte Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand. Maßstabsbalken: 10µm.

Hierbei war die Lokalisation der mutierten Pit2-Fusionsproteine nicht unterscheidbar von der nativen Pit2-Variante (Abb. 17). Sowohl im Falle von Pit2^{Δ44-57}-mCherry, als auch im Falle von Pit2^{mut49-53}-mCherry kam es zur Akkumulation von rot fluoreszierendem Protein im Bereich der biotrophen Interaktionszone um die Pilzhyphe herum (Abb. 17). Außerdem konnte im Bereich von Zell-Zell-Übergängen eine Ausbreitung des entsprechenden Fluoreszenz-Signals beobachtet werden, wie es bereits zuvor für Pit2-mCherry beschrieben wurde (Doehlemann *et al.*, 2011). Da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass es im pflanzlichen Apoplasten zur Abspaltung von Affinitäts-*tags* kommen kann (van Esse *et al.*, 2006), wurden zusätzlich *U. maydis*-Mutanten hergestellt, die Fusionsproteine aus Pit2-, Pit2^{Δ44-57}- oder Pit2^{mut49-53}-mCherry-HA produzierten. Dies ermöglichte die Detektion der entsprechenden Proteine per Western Blot unter Verwendung von HA-spezifischen Antikörpern. Hierzu wurden Proteinextrakte von Maiskeimlingen, die mit den zu untersuchenden *U. maydis*-Mutanten infiziert waren, verwendet. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper ausschließen zu können, wurde SG200-infiziertes Blattmaterial als Negativ-Kontrolle verwendet. Abb. 18 zeigt das Ergebnis einer solchen Analyse.

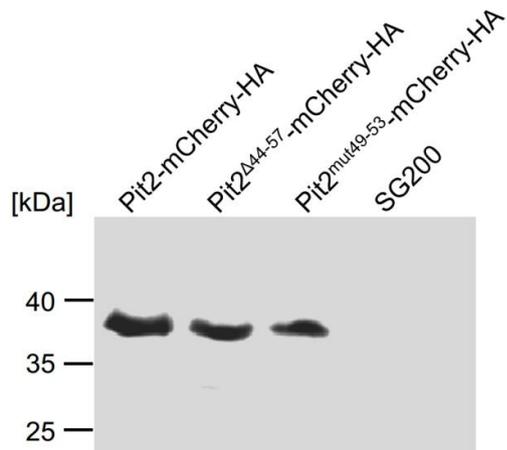


Abb. 18: Western Blot Analyse, um die Stabilität der *in planta* gebildeten, zu mCherry-HA-fusionierten, Pit2-Varianten zu testen. Detektion unter Verwendung anti-HA-spezifischer Antikörper in Protein-Extrakten von *U. maydis*-infizierten Maisblättern. Erwartete Größen: Pit2-mCherry-HA: 38,8kDa, Pit2^{Δ44-57}-mCherry-HA: 37kDa, Pit2^{mut49-53}-mCherry-HA: 38,4kDa. Kein Signal wurde erwartet in Proben, die von SG200-infiziertem Blattmaterial stammten.

In allen drei Fällen konnte das Protein in der erwarteten Größe (Pit2-mCherry-HA: 38,8kDa, Pit2^{Δ44-57}-mCherry-HA: 37kDa, Pit2^{mut49-53}-mCherry-HA: 38,4kDa) detektiert werden (Abb. 18). Insgesamt lässt sich aus den mit mutierten Pit2-Varianten gemachten Experimenten schließen, dass der konservierte Bereich in Pit2 weder zur *in planta*-Expression, noch zur Lokalisation des Proteins benötigt wird, jedoch essentiell für die Virulenz-Funktion dieses Effektors zu sein scheint.

2.3.3 Die konservierte Domäne von Pit2 ist essentiell für die Inhibition von Mais-Cysteinproteasen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die in Pit2 konservierte Domäne sowohl für dessen Virulenz-Funktion essentiell ist, als auch für die Interaktion mit Cysteinproteasen im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Abschnitt 2.3.2). Daher wurde als nächstes überprüft, ob die zuvor gemachten Beobachtungen mit der Funktion von Pit2 als Protease-Inhibitor-Funktion verknüpft werden können. Zu diesem Zweck wurde Pit2^{mut49-53}, unter den gleichen Bedingungen wie natives Pit2, heterolog in *E. coli* hergestellt. Der Einfluss von Pit2^{mut49-53} auf die Aktivität der Mais-Cysteinproteasen wurde anschließend *in vitro*, zunächst unter Verwendung fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit SA-behandelter Maispflanzen, getestet (Abb. 19A).

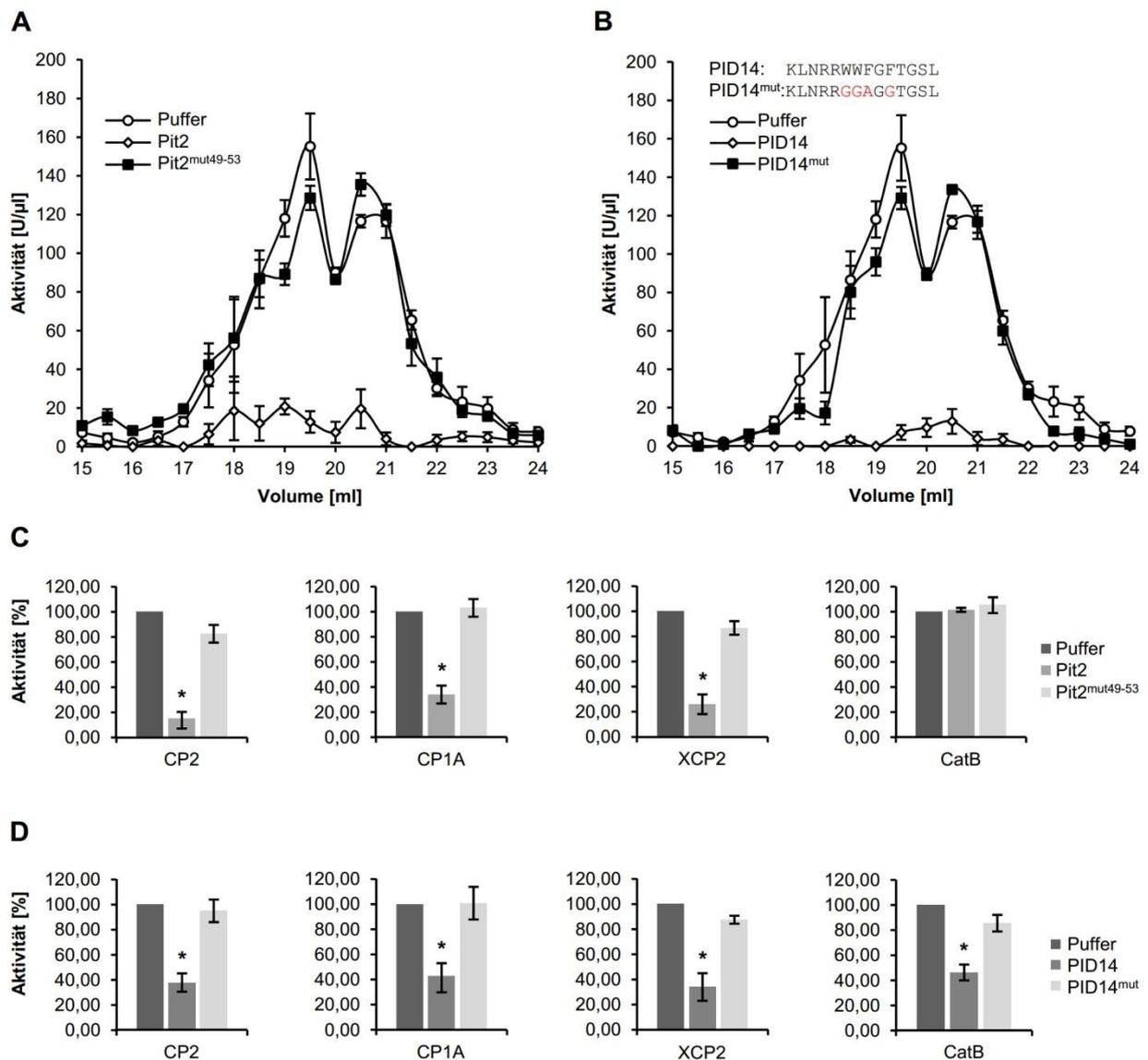


Abb. 19: Spezifische Inhibition apoplastischer Mais-Proteasen durch Pit2 und die Protease-Inhibitor-Domäne PID14. **A:** Protease-Aktivität in fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit SA-behandelter Maispflanzen kann durch Zugabe von 10μM Pit2 inhibiert werden, nicht jedoch durch Zugabe von gleichen Mengen Pit2^{mut49-53}. **B:** Protease-Aktivität der unter (A) gezeigten Fraktionen kann durch Zugabe von 10μM PID14 inhibiert werden, während 10μM PID14^{mut} keinen signifikanten Einfluss auf deren Aktivität hat. **C:** Aktivität der Mais-Proteasen CP1A, CP2, und XCP2, die heterolog in *N. benthamiana* hergestellt wurden, kann durch Zugabe von 10μM Pit2, nicht jedoch durch Zugabe der gleichen Menge Pit2^{mut49-53} inhibiert werden. **D:** Aktivität der Mais-Proteasen CP1A, CP2, XCP2 und CatB, die heterolog in *N. benthamiana* hergestellt wurden, wird durch Zugabe von 10μM PID14 gehemmt, während die Zugabe gleicher Mengen PID14^{mut} keinen Einfluss auf deren Aktivität hat. Die Experimente wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. *, p≤0,05.

Im Gegensatz zu nativem Pit2 hatte die Zugabe gleicher Konzentrationen Pit2^{mut49-53} (10μM) keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der getesteten Proteasen (Abb. 19A, C). Da durch Mutation der konservierten Region auch die Möglichkeit von Pit2 verloren ging, die Aktivität von Mais-Proteasen zu inhibieren, lag die Vermutung nahe, dass dieses Motiv die funktionelle Domäne von Pit2 darstellt. Um dies zu

untersuchen, wurden synthetische Peptide, die der putativen Protease-Inhibitor-Domäne bestehend aus 14 Aminosäuren (PID14) bzw. der mutierten Protease-Inhibitor-Domäne (PID14^{mut}), entsprechen, in Protease-Aktivitätstests getestet (Abb. 19B). Auch in diesem Fall erfolgten die Tests unter Verwendung fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit SA-behandelter Maispflanzen in Anwesenheit des Fluoreszenz-Substrates Z-Phe-Arg-AMC. Tatsächlich zeigte PID14 eine mit Pit2 vergleichbare Protease-Inhibition (Abb. 19B), PID14^{mut} dagegen hatte keinerlei Einfluss auf die Aktivität apoplastischer Proteasen (Abb. 19B). Weiterhin wurde der Einfluss von Pit2, Pit2^{mut49-53}, PID14 und PID14^{mut} auf die Aktivität der individuell in *N. benthamiana* hergestellten Proteasen CP1A, CP2, XCP2 und CatB getestet. Im Gegensatz zu nativem Pit2 zeigte die Zugabe von 10µM Pit2^{mut49-53} hierbei keinerlei Einfluss auf die Aktivität der untersuchten Proteasen (Abb. 19C). Für PID14 hingegen konnte eine Inhibition der Aktivität aller getesteten Proteasen beobachtet werden (Abb. 19D). Dies schließt auch die Aktivität von CatB mit ein, welche durch natives Pit2 nicht beeinflusst wurde (Abb. 19C), wohingegen für PID14^{mut} keine Inhibition der getesteten Proteasen beobachtet werden konnte (Abb. 19D).

Um des Weiteren einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Beobachtungen für PID14 und dessen biologischer Funktion zu untersuchen, wurde die für PID14 kodierende Sequenz hinter der des nativen Signalpeptids von *pit2*, unter Kontrolle des nativen *pit2*-Promotors, im SG200Δ*pit2*-Hintergrund exprimiert. Als Kontrolle diente dabei die Expression der mutierten Version dieses Peptids unter den gleichen Bedingungen. Anschließend wurden sowohl Mutanten, die das entsprechende Konstrukt nur einmal, als auch solche mit Mehrfachintegrationen auf ihr Virulenzverhalten hin untersucht (Abb. 20).

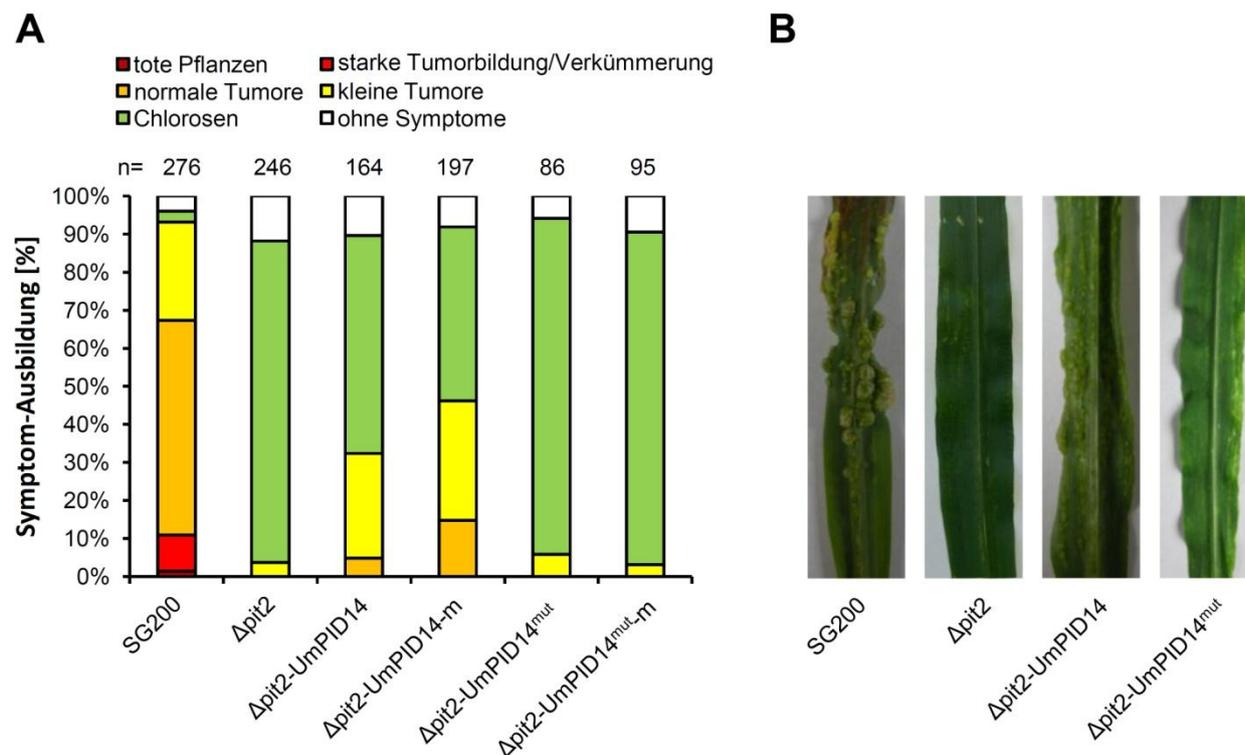


Abb. 20: Expression der PID14 kann Virulenz von SG200Δpit2 teilweise wieder herstellen.

A: Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δpit2: SG200Δpit2, *pit2*-Deletionsmutante. SG200Δpit2-UmPID14: SG200Δpit2 komplementiert mit einem Konstrukt, das den Sequenzabschnitt für PID14 enthält. SG200Δpit2-UmPID14^{mut}: mit einem Konstrukt, das den Sequenzabschnitt für PID14^{mut} enthält. m: für den verwendeten Stamm wurde eine Mehrfachintegration des entsprechenden Konstrukts nachgewiesen. **B:** Beispiel typischer Infektionssymptome ausgelöst durch die unter (A) beschriebenen Stämme, 12dpi.

Durch Integration einer einzelnen Kopie des entsprechenden PID14-Konstruktes kam es zum Auftreten kleiner und vereinzelt sogar normal großer Tumore in Pflanzen, die mit dieser Mutante infiziert wurden (Abb. 20A, B). Dieser Effekt konnte durch Mehrfach-Integration des Konstruktes (Δpit2-UmPID14-m) noch verstärkt werden (Abb. 20A), was auf einen Dosiseffekt hinweist. Die Expression der mutierten, in allen vorherigen Tests nicht funktionellen, PID14-Version hatte keinerlei Einfluss auf die Virulenz der *pit2*-Deletionsmutante, auch nicht im Falle einer Mehrfachintegration des Konstruktes (Abb. 20A). So kam es hierbei im Vergleich zu SG200Δpit2 nicht zu einem erhöhten Auftreten von Tumoren in infizierten Pflanzen (Abb. 20A, B). Durch Lokalisationsstudien unter Verwendung von PID14-/PID14^{mut}-mCherry-Fusionsproteinen wurde auch in diesem Fall die Bildung und Sekretion der entsprechenden Proteine überprüft (Abb. 21).

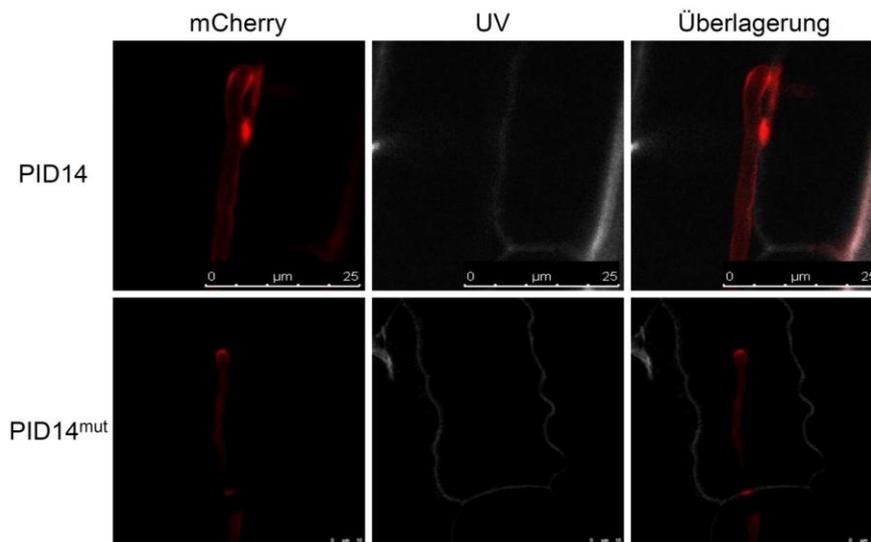


Abb. 21: Lokalisation von PID14 und PID14^{mut}. Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die Sekretion von PID14-mCherry (Oben) und PID14^{mut}-mCherry (Unten) zeigen. Rot: mCherry-Signal. Grau: Durch UV-Laser induzierte Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand.

Auch hier zeigte sich rote Fluoreszenz im Bereich von Hyphenspitzen und an Zell-Zell-Übergängen (Abb. 21), weshalb von der Bildung und Sekretion der beiden Proteine ausgegangen werden kann.

Bislang konnte gezeigt werden, dass Pit2 im Apoplasten mit PLCPs interagiert und diese inhibiert. Um zu untersuchen, ob Pit2 einen Einfluss auf die Gesamt-Cysteinprotease-Aktivität im Mais-Apoplasten hat, wurde apoplastische Flüssigkeit SG200- und SG200 Δ pit2-infizierter Pflanzen isoliert und deren Protease-Aktivität bestimmt (Abb. 22).

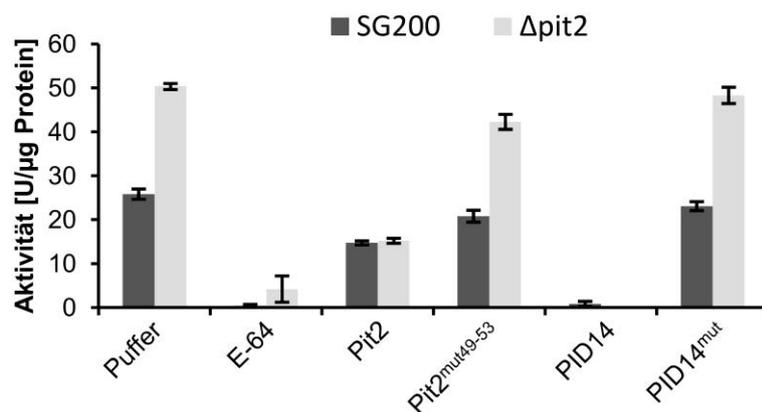


Abb. 22: Protease-Aktivität in apoplastischer Flüssigkeit aus Maispflanzen, die mit *U. maydis* (SG200: dunkelgrau, SG200 Δ pit2: hellgrau) infiziert wurden. Erhöhte Protease-Aktivität in apoplastischer Flüssigkeit aus Pflanzen, die mit SG200 Δ pit2 infiziert wurden im Vergleich zu solcher, die aus SG200-infizierten Pflanzen isoliert wurde. Die erhöhte Aktivität kann durch Zugabe von 10 μ M Pit2 auf ein ähnliches Level gebracht werden, während Zugabe von Pit2^{mut49-53} keinen Einfluss hat. Auch Zugabe von 10 μ M PID14^{mut} beeinflusst die Protease-Aktivität nicht, während Zugabe von 10 μ M PID14, diese komplett inhibiert, ebenso wie Zugabe von 5 μ M E-64. Die Experimente wurden in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Verglichen mit SG200-infizierten Pflanzen wies apoplastische Flüssigkeit von SG200 Δ pit2-infizierten Pflanzen eine etwa zweimal so hohe Cysteinprotease-Aktivität auf (Abb. 22). Dies zeigt, dass die Abwesenheit von Pit2 einen signifikanten Einfluss auf die Erhöhung der Cysteinprotease-Aktivität in *U. maydis*-infiziertem Gewebe hat. Dagegen führte die Zugabe von heterolog hergestelltem Pit2 nur zu einer Reduktion der Protease-Aktivität etwa auf das Niveau von apoplastischer Flüssigkeit SG200-infizierter Pflanzen (Abb. 22). Die Aktivität in apoplastischer Flüssigkeit SG200-infizierter Pflanzen hingegen ließ sich durch Zugabe von Pit2 nicht mehr wesentlich inhibieren (Abb. 22). Zusätzlich zeigte sich, dass weder die Zugabe von Pit2^{mut49-53}, noch die Zugabe von PID14^{mut} einen Einfluss auf die erhöhte Protease-Aktivität in apoplastischer Flüssigkeit SG200 Δ pit2-infizierter Pflanzen hatte (Abb. 22). Die Zugabe von PID14 jedoch führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition der gemessenen Protease-Aktivität, noch unter das Level, das durch Zugabe von nativem Pit2 erreicht wurde, vergleichbar mit der Zugabe von E-64 (Abb. 22). Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis, dass PID14, im Gegensatz zu Pit2, auch die Aktivität von CatB zu inhibieren konnte (vgl. Abb. 19C, D). Dies deutet darauf hin, dass die zuvor für Pit2 beobachtete Spezifität nicht für PID14 zutrifft.

2.4 Pit2-Orthologe aus verwandten Brandpilzen sind nicht redundant im *U. maydis*-Mais-System

Zur Überprüfung einer möglichen Redundanz zwischen Pit2 aus *U. maydis* und den Orthologen aus den verwandten Brandpilzen *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum*, wurden die entsprechenden nativen Gene im SG200 Δ pit2-Hintergrund unter Kontrolle des nativen *pit2*-Promotors aus *U. maydis* exprimiert. Anschließend wurden Maispflanzen mit den entsprechenden Mutanten infiziert und 12dpi auf die Infektionssymptome hin untersucht (Abb. 23).

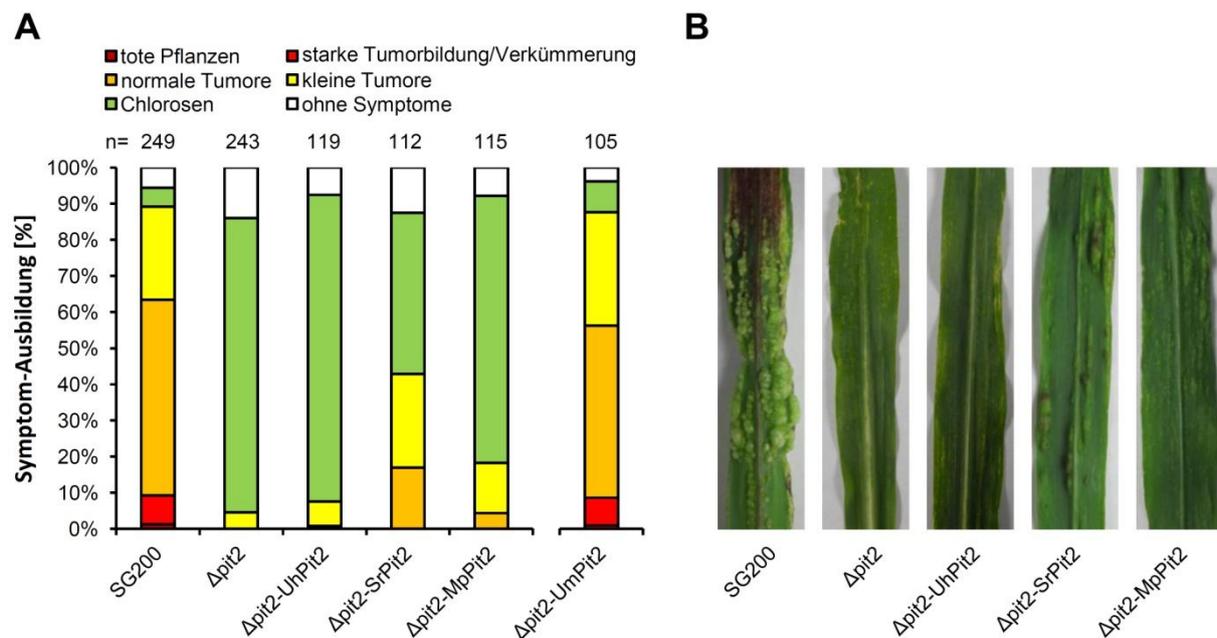


Abb. 23: Expression von *pit2*-Orthologen in SG200Δ*pit2*. **A:** Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen nach Infektion mit *U. maydis* (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δ*pit2*: SG200Δ*pit2*, *pit2*-Deletionsmutante. Δ*pit2*-UhPit2: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Pit2-Ortholog aus *U. hordei*. Δ*pit2*-SrPit2: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Pit2-Ortholog aus *S. reilianum*. Δ*pit2*-MpPit2: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Pit2-Ortholog aus *M. pennsylvanicum*. Δ*pit2*-pit2: SG200Δ*pit2* komplementiert mit *pit2* (Doehlemann *et al.*, 2011; vgl. Abschnitt 2.3.2, Abb. 16) **B:** Infektionssymptome ausgelöst durch die unter (A) beschriebenen Stämme.

Es zeigte sich, dass, im Gegensatz zu UmPit2, keines der Orthologen die Wildtypvirulenz komplett wiederherzustellen konnte (Abb. 23A, B). Durch Expression von *uhpit2* kam es lediglich zum Auftreten einzelner, kleiner Tumore, in etwa vergleichbar mit SG200Δ*pit2* (Abb. 23A, B). Expression von *srpit2* führte zu einer Tumorrates von ca. 40% (Abb. 23A), während die Expression von *mppit2* lediglich das Auftreten von Tumoren mit einer Gesamtrate von etwa 15% zur Folge hatte (Abb. 23A). Keines der Pit2-Orthologe konnte die Bildung starker Symptome wie eine Krümmung der Sprossachse induzieren, wie es zu einem gewissen Prozentsatz normalerweise für Wildtyp-Infektionen üblich ist (Abb. 23A, B).

Auch für die Pit2-Orthologe aus den verwandten Brandpilzen *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum* wurde die Sekretion und Lokalisation entsprechender mCherry-Fusionsproteine mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopes überprüft (Abb. 24).

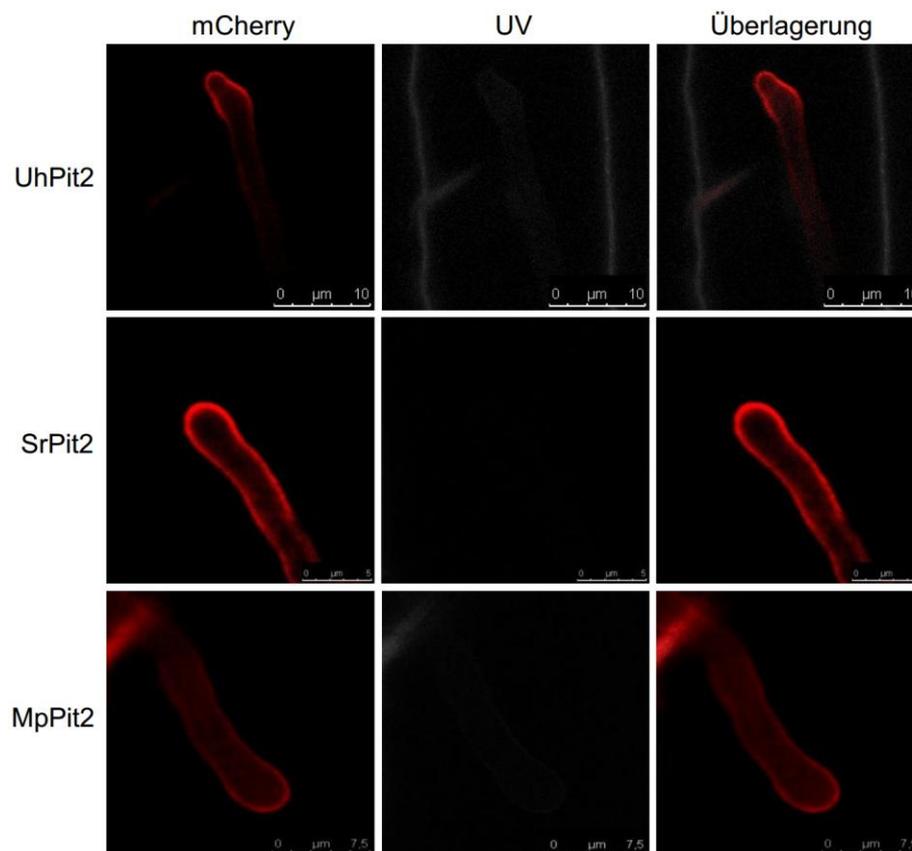


Abb. 24: Lokalisation von Pit2-Orthologen. Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die Sekretion von UhPit2-mCherry (Oben), SrPit2-mCherry (Mitte) und MpPit2-mCherry (Unten) zeigen. Rot: mCherry-Signal. Grau: Durch UV-Laser induzierte Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand.

Die mCherry-fusionierten Versionen der Pit2-Orthologe aus den verwandten Brandpilzen *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum* zeigten eine sich von UmPit2-mCherry (vgl. Abschnitt 2.3.2, Abb. 17) nicht unterscheidbare Lokalisation im Wirtsgewebe (Abb. 24).

2.5 PID14 aus Pit2-Orthologen anderer Brandpilze sind in der *U. maydis*-Mais Interaktion nicht funktionell

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass alleine die Expression der UmPID14 die Funktion von Pit2 teilweise ersetzt (Abschnitt 2.3.3). In Anbetracht der starken Konservierung der PID14-Region in Pit2-Orthologen wurde als nächstes getestet, ob die Virulenz von SG200 Δ pit2 durch die PID14-Regionen aus den Pit2-Orthologen der verwandten Brandpilze *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum* ebenfalls wiederhergestellt werden kann. Dafür wurden die entsprechenden Sequenzabschnitte hinter der Sequenz des nativen Signalpeptids von *U. maydis*

pit2, unter Kontrolle des nativen *pit2*-Promotors, im SG200 Δ *pit2*-Hintergrund exprimiert. Da auch für UmPID14 schon eine stärkere Tumorbildung bei Mehrfachintegration des Konstrukts in den *ip*-Lokus beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 2.3.3, Abb. 20A), wurden auch zur Untersuchung der orthologen PID14-Regionen Mutanten mit Mehrfach-Integration verwendet (Abb. 25).

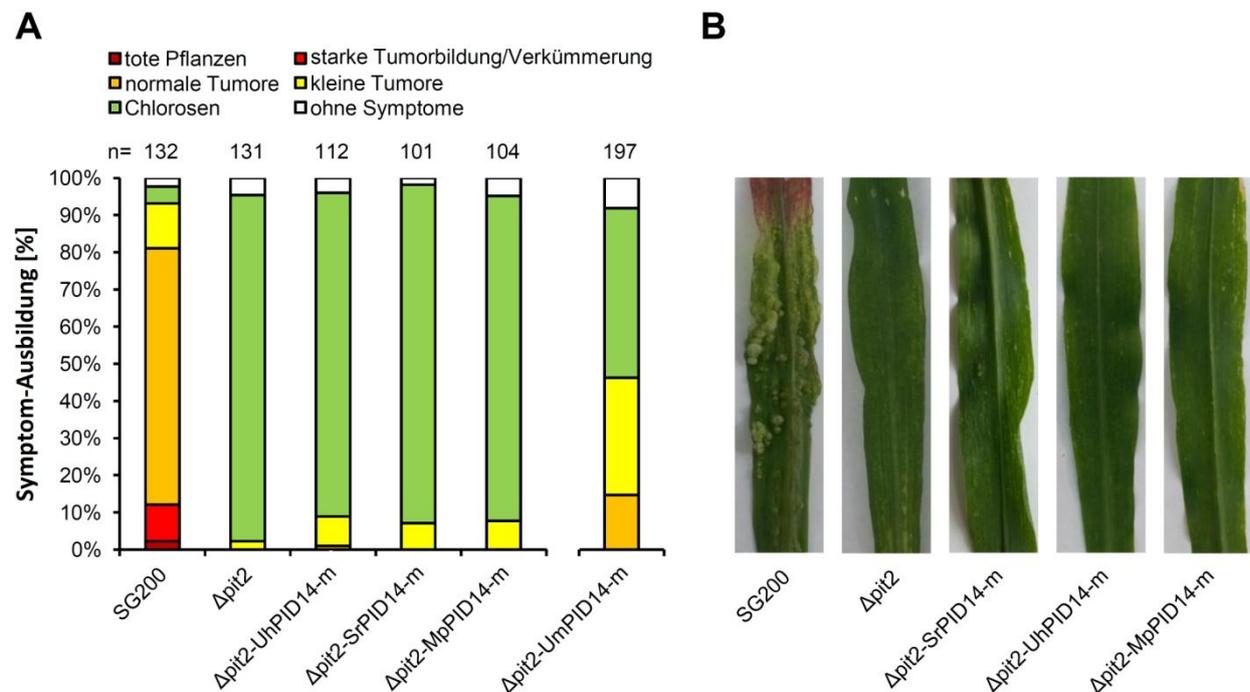


Abb. 25: Einfluss orthologer PID14-Regionen auf Virulenz von SG200 Δ *pit2*. **A:** Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen nach Infektion mit *U. maydis* (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δ *pit2*: SG200 Δ *pit2*, *pit2*-Deletionsmutante. Δ *pit2*-UhPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit PID14-Ortholog aus *U. hordei*. Δ *pit2*-SrPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit PID14-Ortholog aus *S. reilianum*. Δ *pit2*-MpPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit PID14-Ortholog aus *M. pennsylvanicum*. Δ *pit2*-UmPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit PID14 aus *U. maydis* (vgl. Abschnitt 2.3.3, Abb. 20). **B:** Infektionssymptome ausgelöst durch die unter (A) beschriebenen Stämme.

Die Expression der verschiedenen PID14-Orthologe im SG200 Δ *pit2*-Hintergrund führte, im Gegensatz zur UmPID14 (Abb. 25; vgl. Abschnitt 2.3.3, Abb. 20), nicht zur Komplementation des Phänotyps der *pit2*-Deletionsmutante (Abb. 25A, B). Lediglich die Entstehung kleiner Tumore war leicht erhöht, überstieg jedoch insgesamt nie 10% (Abb. 25A). Auch für die PID14-Orthologen wurde die Sekretion von mCherry-Fusionen mikroskopisch verifiziert, wobei keine Unterschiede zu UmPID14-mCherry beobachtet werden konnten (siehe Anhang, Abb. 32; vgl. Abschnitt 2.3.3, Abb. 21 für UmPID14-mCherry).

2.6 Die Aktivität von Pit2 in der *U. maydis*-Mais-Interaktion wird maßgeblich durch die PID14-Region bestimmt

Um die Funktion der PID14-Region und der N- und C-terminalen Bereiche von Pit2 weiter zu untersuchen, wurden chimäre Konstrukte hergestellt, in denen die verschiedenen Bereiche von Pit2 unterschiedlich kombiniert wurden. Der schematische Aufbau der verwendeten Konstrukte ist in Abb. 26 dargestellt. Die zugehörigen Sequenzen der relevanten Aminosäureabschnitte sind in Tab. 12 des Anhangs aufgeführt.

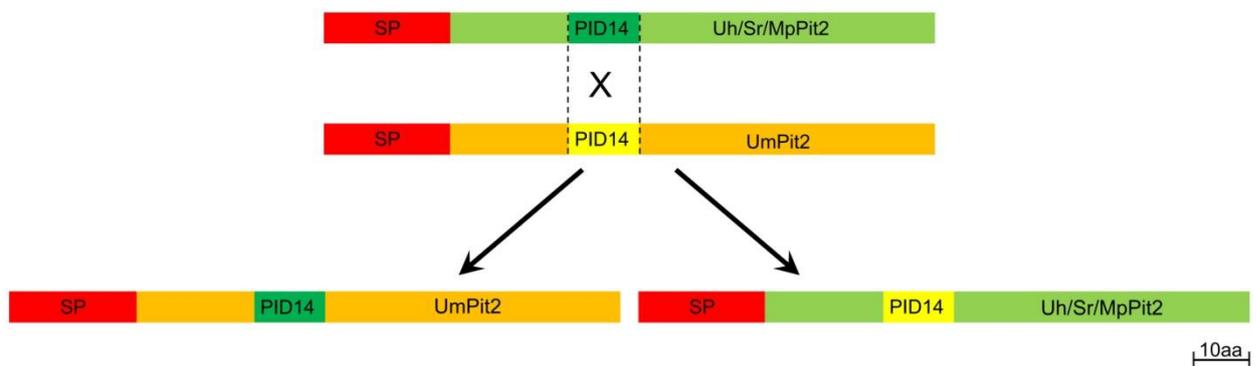


Abb. 26: Schematische Darstellung hergestellter Pit2-Chimären. Es wurden sowohl Konstrukte für Chimären hergestellt, bei denen die PID14-Region von *U. hordei*, *S. reilianum* oder *M. pennsylvanicum* in UmPit2 (linke Seite) integriert wurde, als auch solche, bei denen die UmPID14 in UhPit2, SrPit2 oder MpPit2 integriert wurde (rechte Seite). SP: Signalpeptid.

Zunächst wurden Chimären untersucht, die *U. maydis* Pit2, kombiniert mit der PID14 aus einem der drei Orthologen, enthielten (Abb. 27A, B). Parallel dazu wurden, Rahmen der Bachelorarbeit von Marlen Breuer, Konstrukte hergestellt, bei denen die UmPID14 in die Pit2-Orthologe aus *U. hordei*, *S. reilianum* oder *M. pennsylvanicum* integriert wurde (Abb. 27C, D).

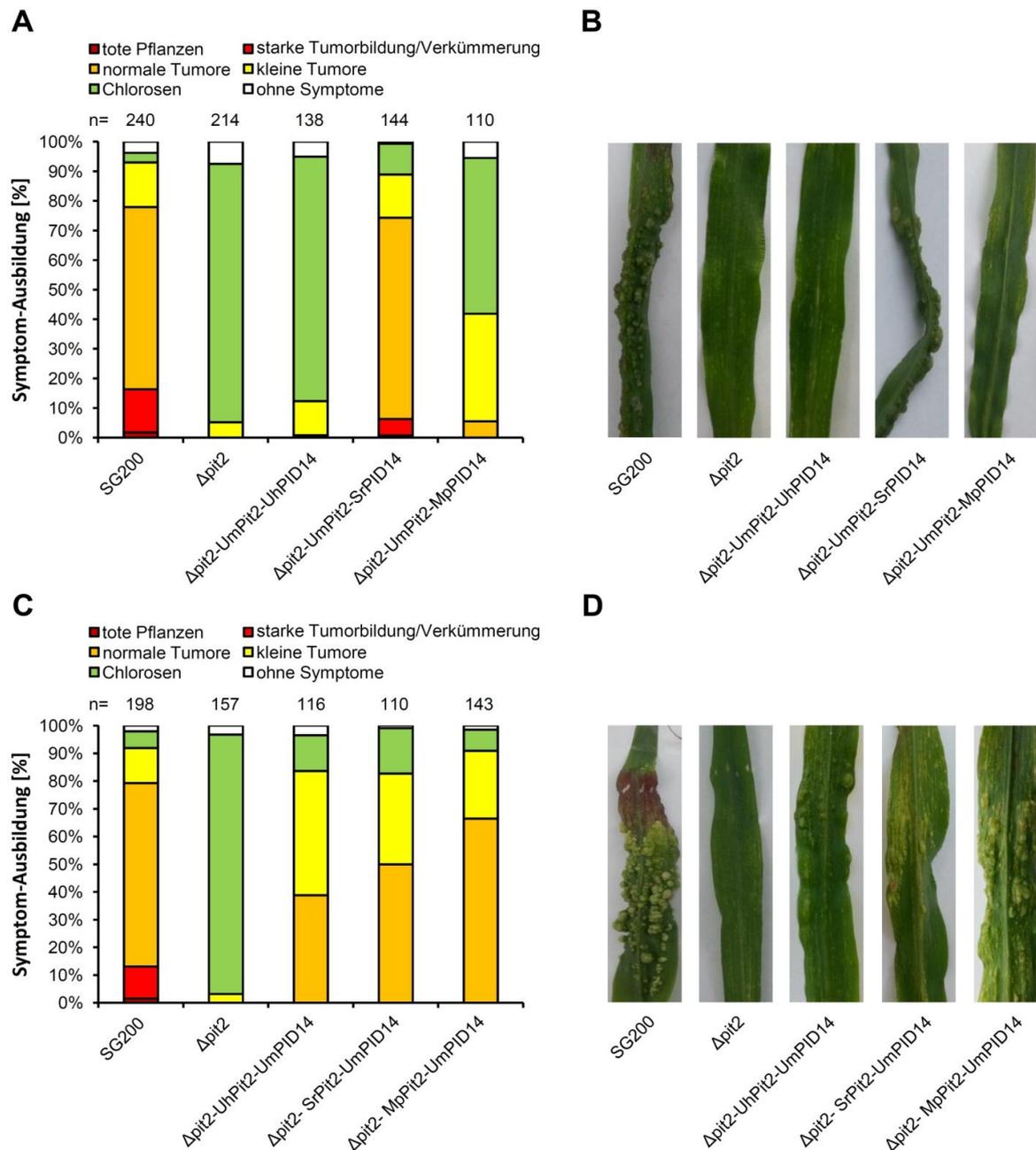


Abb. 27: Expression verschiedener *pit2*-Chimären in SG200 Δ *pit2*. **A:** Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen nach Infektion mit *U. maydis* (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δ *pit2*: SG200 Δ *pit2*, *pit2*-Deletionsmutante. Δ *pit2*-UmPit2-UhPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UmPit2 kombiniert mit UhPID14 (siehe auch Anhang, Tab. 12). Δ *pit2*-UmPit2-SrPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UmPit2 in Kombination mit SrPID14 (siehe auch Anhang, Tab. 12). Δ *pit2*-UmPit2-MpPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UmPit2 kombiniert mit MpPID14 (siehe auch Anhang, Tab. 12). **B:** Infektionssymptome ausgelöst durch die unter (A) beschriebenen Stämme. **C:** Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen mit *U. maydis* (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δ *pit2*: SG200 Δ *pit2*, *pit2*-Deletionsmutante. Δ *pit2*-UhPit2-UmPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UhPit2 in Kombination mit UmPID14 (siehe auch Anhang, Tab. 12). Δ *pit2*-SrPit2-UmPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus SrPit2 kombiniert mit UmPID14 (siehe auch Anhang, Tab. 12). Δ *pit2*-MpPit2-UmPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus MpPit2 kombiniert mit UmPID14 (siehe auch Anhang, Tab. 12). **D:** Infektionssymptome ausgelöst durch die unter (C) beschriebenen Stämme.

Dabei zeigte sich, dass lediglich UmPit2-SrPID14 zu einer Komplementation des SG200 Δ pit2-Phänotyps führte (Abb. 27A, B). Im Falle von UmPit2-MpPID14 dagegen konnte eine Tumorrage von etwa 40% erreicht, wobei in nur etwa 5% der Fälle Tumore mit einer normalen Größe auftraten (Abb. 27A, B), während es für UmPit2-UhPID14 in ca. 10% der infizierten Pflanzen zur Entstehung von kleinen Tumoren kam (Abb. 27A, B). Für alle drei Pit2-Orthologe mit UmPID14 zeigte sich eine partielle Komplementation des *pit2*-Deletionsphänotyps (Abb. 27C, D). So trat bei allen drei getesteten Varianten eine Gesamttumorrage von ca. 80-90% auf, wobei jedoch die Entstehung starker Tumore vollständig ausblieb (Abb. 27C, D). Den stärksten Effekt zeigte dabei SG200 Δ pit2-MpPit2-UmPID14, wo es in 90% der Pflanzen zu Tumorbildung kam (Abb. 27C, D). Auch für die verschiedenen Pit2-Chimären wurde die Bildung und Sekretion entsprechender mCherry-fusionierter Proteine mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie überprüft. Hierbei zeigten alle eine, sich nicht von UmPit2-mCherry unterscheidbare, Lokalisation (siehe Anhang, Abb. 33; vgl. Abschnitt 2.3.2, Abb. 17 für UmPit2-mCherry).

2.7 Inhibition von Cysteinproteasen durch PID14-Orthologe

Da es bislang nicht möglich war, die orthologen Pit2-Proteine heterolog in *E. coli* herzustellen (Daten nicht gezeigt), wurde der Einfluss synthetischer PID14-Peptide der entsprechenden Pit2-Orthologe aus *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum* auf die Aktivität von Mais-Proteasen getestet (Abb. 28).

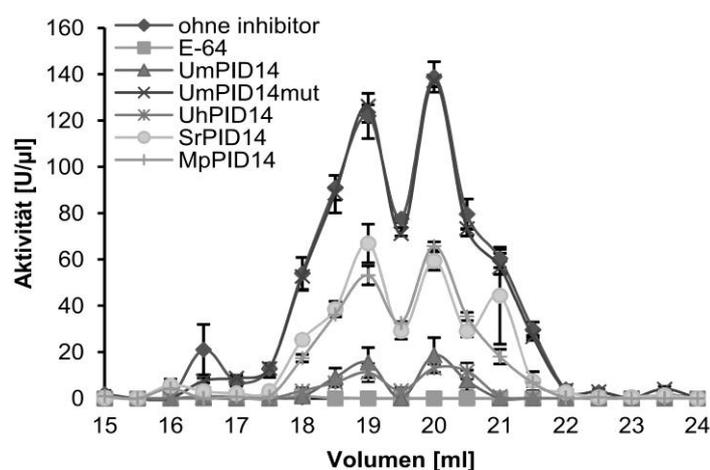


Abb. 28: Inhibition von Mais-Cysteinproteasen durch PID14-Orthologe. Einfluss von je 10 μ M verschiedener PID14-Varianten auf Protease-Aktivität fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit SA-behandelter Maispflanzen.

Überraschenderweise zeigte UhPID14 eine mit UmPID14 vergleichbare Protease-Inhibition (Abb. 28). So konnte durch Zugabe von 10µM UmPID14 die Cysteinprotease-Aktivität in den relevanten Fraktionen (17,5-21,5ml) durchschnittlich auf etwa 2,6% der Aktivität der Proben ohne Inhibitor bzw. mit 10µM UmPID14^{mut}, welche als Kontrollen verwendet wurden, inhibiert werden (Abb. 28). Die Zugabe von 10µM UhPID14 führte zu einer durchschnittlichen Aktivität von etwa 5,9% im Vergleich zu den Kontrollen (unbehandelt, mit UmPID14^{mut} behandelten Proben) (Abb. 28). Gleiche Mengen SrPID14 oder MpPID14 hatten dagegen einen geringeren Einfluss auf die Protease-Aktivität in den getesteten Fraktionen und konnten diese auf durchschnittlich 42,7% (SrPID14) bzw. 34,2% (MpPID14) inhibieren (Abb. 28).

Innerhalb der PID14 unterscheidet sich die Aminosäuresequenz von UmPit2 durch fünf Reste von der von UhPit2, wobei in zwei Fällen ein Austausch einer aromatischen Aminosäure in eine andere aromatische Aminosäure zu beobachten ist (Abb. 14, Tab. 2). Da die UhPID14 innerhalb von UmPit2 in der Pflanze nicht funktionell zu sein scheint (siehe Abschnitt 2.6, Abb. 27A, B), wurde als nächstes getestet, welche Aminosäure-Reste für den Funktionsverlust verantwortlich sind. Daher wurden zunächst zwei verschiedene, mutierte *pit2*-Varianten in SG200Δ*pit2* exprimiert. Die relevanten Sequenzabschnitte inklusive der zugehörigen Mutationen sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Verwendete UmPit2-Varianten mit partiell veränderter PID14-Region. Veränderte bzw. in UhPit2 vorkommende Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Reste, die nicht zur jeweiligen PID14 gehören sind grau gekennzeichnet.

Name	Sequenz (Pit2 Aminosäuren 41-60)
UmPit2	...AAGKLNRRWWFGFTGSLGKE...
UmPit2-PID14 ^{mutUh1}	...AAGKLHRRWFLFPGLGKE...
UmPit2-PID14 ^{mutUh2}	...AAGKLNRRWYFGWTGSLGKE...
UhPit2	...YITKLHRRWYFLWPGSLAPK...

Bei UmPit2-PID14^{mutUh1} wurden die Reste N46, G52 und T54 der UmPID14 durch die entsprechenden Reste aus der UhPID14 ersetzt (Tab. 2). Bei UmPit2-PID14^{mutUh2} wurden die konservierten aromatischen Aminosäuren W50 und F53 durch die aus der UhPID14 ausgetauscht, bei denen es sich mit Tyrosin und Tryptophan ebenfalls um aromatische Aminosäuren handelt (Tab. 2). Die

Auswirkungen der Expression der entsprechenden Konstrukte auf die Virulenz der *pit2*-Deletionsmutante sind in Abb. 29 dargestellt.

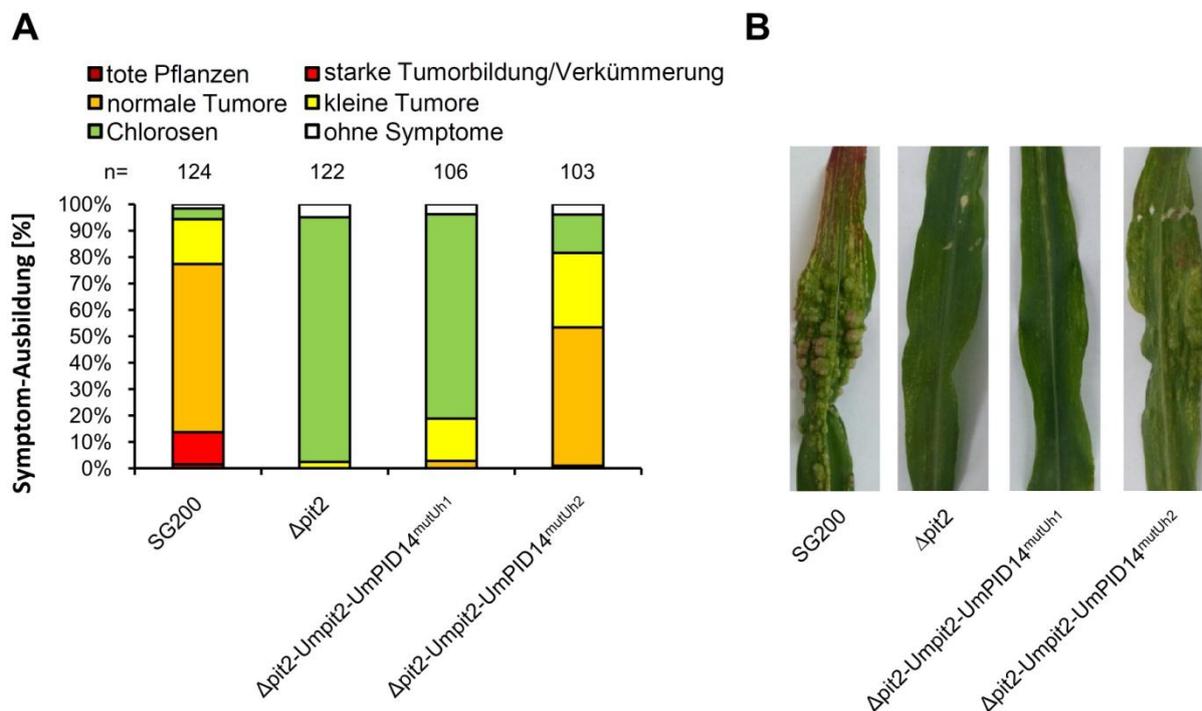


Abb. 29: Expression von *umpit2*-Varianten, deren PID14-Bereiche teilweise durch die aus *UhPID14* ersetzt wurden, in *SG200 $\Delta pit2$* . **A: Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maiskeimlingen nach Infektion mit *U. maydis* (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. $\Delta pit2$: *SG200 $\Delta pit2$* , *pit2*-Deletionsmutante. UmPit2-PID14^{mutUh1}: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UmPit2 kombiniert mit UmPID14, bei der die entsprechenden Reste teilweise durch solche aus *UhPID14* ersetzt wurden (siehe auch Tab. 2). UmPit2-PID14^{mutUh2}: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UmPit2 kombiniert mit UmPID14, bei der die entsprechenden Reste teilweise durch solche aus *UhPID14* ersetzt wurden (siehe auch Tab. 2). **B:** Infektionssymptome ausgelöst durch die unter (A) beschriebenen Stämme.**

Bereits der Austausch der drei UmPID14-Aminosäuren N46, G52 und T54 (UmPit2-PID14^{mutUh1}) durch die entsprechenden Reste der *UhPID14* führte zu einem Infektions-Phänotyp, der von dem der *pit2*-Deletionsmutante kaum unterscheidbar war (Abb. 29). Allerdings konnten in diesem Fall sehr vereinzelt Tumore normaler Größe und eine leicht erhöhte Rate kleiner Tumore, die mit einem Gesamtanteil von etwas mehr als 10% auftraten, beobachtet werden (Abb. 29A). Im Falle von UmPit2-UmPID14^{mutUh2} betrug die Gesamttumorraten in etwa 80%, wobei jedoch die Entstehung starker Tumore vollständig ausblieb und im Vergleich zu SG200-Infektionen ein verstärktes Auftreten von Chlorosen auftrat (Abb. 29A, B).

Auch für die UmPit2-Varianten, die eine teilweise mutierte PID14 in Richtung der von *UhPID14* beinhalteten, wurde die Expression und Sekretion mithilfe mCherry-fusionierter Protein-Versionen überprüft (siehe Anhang, Abb. 34). In beiden Fällen

(UmPit2-PID14^{mutUh1} und UmPit2-PID14^{mutUh2}) konnte die Bildung und Sekretion der entsprechenden Proteine durch konfokale Mikroskopie bestätigt werden. Es zeigte sich dabei keine von UmPit2-mCherry unterscheidbare Lokalisation (siehe Anhang, Abb. 34; vgl. Abschnitt 2.3.2, Abb. 17 für UmPit2-mCherry).

2.8 Identifikation von Pit2-ähnlichen Proteinen in Bakterien

Durch eine Struktur-basierte BLAST-Analyse mithilfe des „hhblits“-Online-tools (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhblits/>) und unter Verwendung der UmPID14-Sequenz als *query*, konnte ein PID14-ähnlicher Bereich in einem Protein des Bodenbakteriums *Streptomyces* sp. AA4, sowie in dem pflanzenpathogenen Ascomycet *Fusarium solani* identifiziert werden. Weitere Analysen unter Zuhilfenahme der Proteinsequenz aus *Streptomyces* sp. AA4 führten auch zur Identifikation von Proteinsequenzen der Bodenbakterien *Amycolatopsis mediterranei* und *Burkholderia vietnamiensis*, die ebenfalls PID14-ähnliche Bereiche beinhalten. Ein Sequenzvergleich von UmPit2 mit bakteriellen Proteinen, die eine PID14-Region beinhalten ist in Abb. 30 dargestellt.

```

U. maydis          1  ---MLFRSAFVLLIVAFASACLVQHVVQAI FVRRSLS----
Streptomyces sp. AA4  1  ---MHDTASPNGAETNGATAVIHET---PTRDNATAGDE
Amycolatopsis mediterranei  1  MASPDTDELATVPLPAGQPEAAQVPARRAAPEAREVG----

U. maydis          34  -----T-----
S. sp. AA4         34  AAKATPERHE-----
A. mediterranei    38  -----APRQERTEAAPHEAGAAQSGELREAAAAQPEALGAAGEPNVEQ

U. maydis          35  -----DASMSSAAGKLNRRWWFGFTGSLGKEPDNG
S. sp. AA4         45  -----SSAGPK-PRGRWWHGFTGSVAAGMAVL
A. mediterranei    81  ERVAPERIEPGDTAPDIEASAPTEPAK-ERGRWWRGFTGSLAAGLTVL

U. maydis          65  QVQIKII-----PDA-LI IKNPPANKDDLNKLIENL--KRKHPR
S. sp. AA4         71  AVGV LIV-----GVL-CLVNGAPG--PGVLKLV-----GHFV
A. mediterranei   128  AIGVLVVAGVCLFTGAPGATLLVGHVAAA--LALLAQRVADRRNGFP

U. maydis          99  FK---TVVMPTDPNGD-----VVIWE-
S. sp. AA4        98  AA---VIMLALQRIADRRAGKAAVAAGVGVLVVAGVAFSLLWWF
A. mediterranei   174  AAGAGVAVVLFVTSAL-----TLFWLT

```

Abb. 30: Konservierung der PID14 in bakteriellen Proteinen. Vergleich der Aminosäuresequenzen von UmPit2 mit Proteinen aus *Streptomyces* sp. AA4 und *A. mediterranei*. Der orange umrahmte Bereich kennzeichnet die PID14-Region.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die untersuchten Sequenzen einen sehr niedrigen Grad an Konservierung aufweisen. So beträgt der Anteil identischer Reste zwischen UmPit2 und *Streptomyces* sp. AA4 16% und zwischen UmPit2 und *A. mediterranei* Pit2 17%. Nur die für die Funktion von UmPit2 essentielle PID14-Region liegt hoch

konserviert vor. Um die funktionelle Konservierung einer bakteriellen PID14 zu testen, wurde, der in dem entsprechenden *Streptomyces* sp. AA4-Protein konservierte PID14-Bereich gewählt und anstelle der UmPID14 in UmPit2 eingefügt. Es folgte die Integration des entsprechenden Konstrukts in den *ip*-Lokus von SG200 Δ pit2 und die Infektion von Maiskeimlingen mit resultierenden Mutanten (Abb. 31).

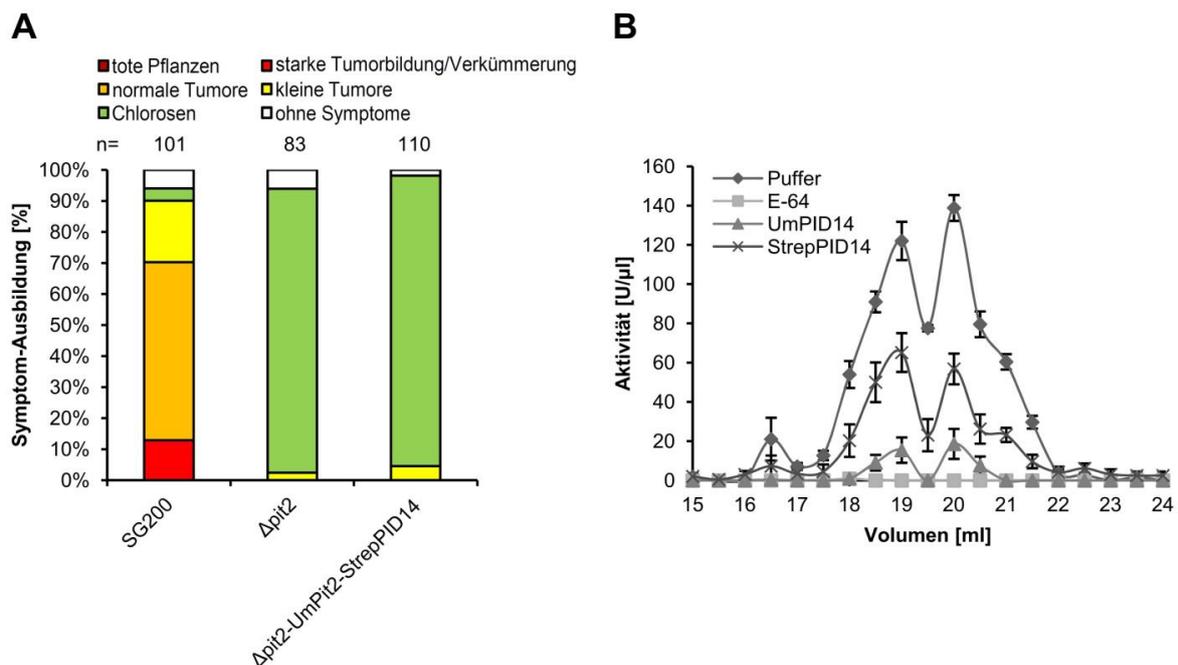


Abb. 31: Einfluss einer bakteriellen PID14 (StrepPID14) auf die Virulenz von *U. maydis* und die Aktivität von Mais-Cysteinproteasen. **A:** Quantifizierung von Infektionssymptomen von *U. maydis*-infizierten Maiskeimlingen (12dpi). SG200: Virulenter *U. maydis*-Stamm, der Wildtyp-Symptome auslöst. Δ pit2: SG200 Δ pit2, *pit2*-Deletionsmutante. Δ pit2-UmPit2-StrepPID14: *pit2*-Deletionsmutante komplementiert mit Chimäre bestehend aus UmPit2 in Kombination mit StrepPID14. **B:** Protease-Aktivitätstest in fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit SA-behandelter Maispflanzen in Anwesenheit von je 10 μ M UmPID14, StrepPID14 oder 5 μ M E-64.

Wie in Abb. 31A zu sehen ist, führte die Herstellung des chimären Proteins UmPit2-StrepPID14 nicht zu einer Wiederherstellung der SG200-Virulenz in infizierten Maispflanzen. Im Gegenteil dazu entsprach der beobachtete Phänotyp weiterhin dem der *pit2*-Deletionmutante (Abb. 31A). Analog zu den Experimenten mit den PID14-Bereichen aus den Orthologen der nahe verwandten Brandpilze (vgl. Abschnitt 2.7, Abb. 28), wurde auch der Einfluss der StrepPID14 auf die Aktivität der apoplastischen Cysteinproteasen überprüft (Abb. 31B). Die Zugabe von 10 μ M StrepPID14 zu den Fraktionen apoplastischer Flüssigkeit SA-behandelter Maispflanzen führte in den relevanten Fraktionen (17,5-21,5ml) zu einer Reduktion der gemessenen Protease-Aktivität auf durchschnittlich etwa 39,5% der Aktivität in

der Puffer-Kontrolle (Abb. 31B). Die Inhibition war somit nicht so stark, wie es durch Zugabe gleicher Mengen UmPID14 oder 5 μ M E-64 erreicht werden konnte (Abb. 31B) und entsprach in etwa der, wie sie für die Zugabe gleicher Mengen SrPID14 oder MpPID14 beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 2.7, Abb. 28).

3 Diskussion

3.1 Inhibition apoplastischer Cysteinproteasen durch Pit2

In einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse unter Verwendung einer aus *U. maydis* infiziertem Pflanzenmaterial hergestellten cDNA-Bank wurde die Mais-Cysteinprotease CP2 als Interaktionspartner für Pit2 identifiziert. Dieses Ergebnis war ein maßgeblicher Hinweis auf die Funktion von Pit2, da CP2 eine von fünf apoplastischen Cysteinproteasen ist, die als essentielle Bestandteile zur Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen dienen (van der Linde *et al.*, 2012a). Der Mechanismus der Pit2-CP2-Interaktion ist bislang nicht bekannt, jedoch spricht die Tatsache, dass eine Bindung zu CP2 nur in Abwesenheit der inhibitorischen Prodomäne stattfinden kann dafür, dass die katalytische Domäne für eine erfolgreiche Interaktion zugänglich sein muss. Zusammen mit dem Ergebnis, dass Pit2 die Aktivität der Proteasen aus fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit konzentrationsabhängig inhibieren konnte, kann vermutet werden, dass es sich um eine kompetitive Inhibition der Zielproteine handelt. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von CP2 für eine Interaktion mit Pit2 nicht von Bedeutung ist, da die Mutation der katalytischen Triade dieser Cysteinprotease keine Auswirkungen auf deren Interaktion hat. Um endgültig zu zeigen, auf welchem Weg Pit2 auf molekularer Ebene mit seinen Zielproteinen interagiert, könnten zukünftige Ansätze weitere Mutationstudien beinhalten. Dies könnte dabei helfen, die für die Interaktion essentiellen Reste auf Seiten der Protease zu identifizieren. Zusätzlich könnte der Interaktionsmechanismus zwischen Pit2 und CP2 durch Kristallisation als Proteinkomplex aufgeklärt werden. Voraussetzung hierfür wäre jedoch, dass beide Proteine in ausreichender Menge heterolog hergestellt werden können, was momentan nur für Pit2 möglich ist.

Obwohl die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse keine weiteren Interaktionspartner hervorbrachte, konnte durch individuelle Interaktionstests gezeigt werden, dass Pit2 auch mit zwei CP1-Isoformen (CP1A, CP1B) und XCP2, nicht jedoch mit CatB interagiert. Dies und die Tatsache, dass die Zugabe von Pit2 in Aktivitätstests mit fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit nicht in allen Fraktionen eine mit E-64 vergleichbare Inhibition erbrachte, spricht für eine spezifische Interaktion von Pit2 mit

den getesteten Proteasen. Auch die Aktivität von kommerziell erhältlichem Papain, das ebenfalls eine zur C1 Familie (Clan CA) gehörende Protease ist, konnte durch die Zugabe von Pit2 nicht beeinflusst werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass sich die Spezifität von Pit2 gegenüber seiner Zielproteine von der des Mais-Cystatins CC9 unterscheidet, welches die Aktivität aller getesteten apoplastischen Cysteinproteasen und auch die von Papain vollständig inhibiert. Ferner konnte gezeigt werden, dass CC9 mit allen fünf getesteten, apoplastischen Mais-PLCPs interagiert (van der Linde *et al.*, 2012a, 2012b). Weiterhin stellt sich die Frage, warum zur Etablierung einer biotrophen Interaktion von *U. maydis* mit Mais die Inhibition apoplastischer Cysteinproteasen sowohl von Wirtsseite (CC9), als auch von Pathogeneseite (Pit2) erforderlich ist. Versuche, *cc9* im SG200 Δ *pit2*-Hintergrund zu exprimieren, haben nicht zur Wiederherstellung der Wildtypvirulenz geführt (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass beide Inhibitoren unabhängig voneinander benötigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass CC9 überwiegend zu Beginn der initialen Penetrationsphase gebildet wird und eine Lokalisation im gesamten Apoplasten zeigt (van der Linde *et al.*, 2012a). Pit2 hingegen wird vor allem kurz nach der Penetration, sowie zu späteren Zeitpunkten für die Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion benötigt und lokalisiert überwiegend in der biotrophen Interaktionszone (Doehlemann *et al.*, 2011). Somit besteht sowohl ein zeitlicher, als auch ein räumlicher Unterschied für die beiden Proteine, was die gemachten Beobachtungen erklären könnte. Des Weiteren muss in diesem Zusammenhang jedoch erwähnt werden, dass sowohl die Bildung, als auch die Sekretion von CC9 in *U. maydis* bisher weder mikroskopisch, noch immunologisch bestätigt wurde. Um die zuvor gemachten Vermutungen zu überprüfen, könnten alternativ auch Maispflanzen, die *cc9* nachweislich konstitutiv überexprimieren (van der Linde *et al.*, 2012a) zur Infektion mit der *pit2*-Deletionsmutante verwendet werden.

3.2 Ein konserviertes Motiv in Pit2 fungiert als Protease-Inhibitor-Domäne

Pit2 ist selbst in nah verwandten Brandpilzen nur schwach konserviert und es konnten bisher keine Orthologen in Pilzen außerhalb der Ustilaginales identifiziert werden. Eine solch starke Diversifizierung ist ein weit verbreitetes Phänomen bei Effektor-Proteinen und resultiert aus dem evolutionären Druck, dass solche Proteine

einerseits mit ihren Zielproteinen interagieren müssen, um die Virulenz des Pathogens zu begünstigen und sich andererseits stetig verändern müssen, um einer Erkennung durch das pflanzliche Immunsystem zu entgehen (Haas *et al.*, 2009; Schirawski *et al.*, 2010).

Die Pit2-Orthologe aus *U. maydis*, *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum* weisen lediglich 13 identische Reste auf. Acht davon befinden sich in der 14 Aminosäure-langen Region (PID14), die als funktionelle Domäne von Pit2 definiert werden konnte und durch Mutagenese-Studien bestätigt wurde. Veränderungen in dieser Region führten sowohl zu einem Verlust der Protease-Pit2-Interaktion in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen, als auch zu einem Verlust der Protease-Inhibition durch das entsprechende, heterolog in *E. coli* hergestellte Protein in *in vitro*-Experimenten. Zudem konnte keine Wiederherstellung der Wildtypvirulenz erreicht werden, wenn entsprechende, mutierte *pit2*-Varianten im SG200 Δ *pit2*-Hintergrund exprimiert wurden. Ein weiterer Beweis, dass die PID14 die funktionelle Domäne von Pit2 darstellt, ergab sich durch Experimente, die zeigten, dass die PID14 im Gegensatz zur mutierten Variante PID14^{mut}, alleine sowohl die Aktivität der getesteten Cysteinproteasen *in vitro* inhibieren, als auch den Phänotyp der *pit2*-Deletionsmutanten teilweise komplementieren konnte. Dies zeigt eine Verbindung der Beobachtungen aus den *in vitro*-Experimenten mit der *in vivo*-Funktion. Im Gegensatz zu Pit2 konnte das synthetisch hergestellte UmPID14-Peptid die Protease-Aktivität in apoplastischer Flüssigkeit aus SG200-, als auch SG200 Δ *pit2*-infizierten Maispflanzen inhibieren. Darüber hinaus wurde auch die Aktivität von CatB durch UmPID14 inhibiert, wodurch die für Pit2 beobachtete Spezifität gegenüber seinen Ziel-Proteinen bei dem verwendeten Peptid nicht zutreffend war. Interessanterweise unterscheidet sich Pit2 von Effektoren anderer Pflanzenpathogene, für die ebenfalls eine Protease-Inhibitor-Aktivität beschrieben wurde dahingehend, dass auffällige Charakteristika wie das Vorhandensein von Cysteinresten oder typische Sequenzmotive, die auf eine Funktion als Protease-Inhibitor hindeuten, hierbei gänzlich fehlen. Protease-Inhibitoren aus *P. infestans* z. B. besitzen typische Merkmale, wodurch diese in Kazal-ähnliche Proteine im Falle von Serinprotease-Inhibitoren oder Cystatin-ähnliche Proteine im Falle von Cysteinprotease-Inhibitoren klassifiziert werden können (Tian *et al.*, 2005, 2007). Auch Avr2 aus *C. fulvum*, welches die beiden Tomaten-Cysteinproteasen RCR3 und PIP1 in nicht-kompetitiver Weise inhibiert, besitzt Sequenz-Motive, die denen von

Phytocystatinen ähneln und das auffallendste Merkmal dieses Effektors sind acht Cysteinreste, die vier Disulphidbrücken ausbilden (van't Klooster *et al.*, 2011).

3.3 Pit2-Orthologe aus verwandten Brandpilzen können die Funktion von UmPit2 in der *U. maydis*-Mais Interaktion nicht ersetzen

Aufgrund der Tatsache, dass Pit2 zwar nur relativ schwach in verwandten Brandpilzen konserviert ist, jedoch die funktionelle Domäne im Gegensatz dazu einen sehr hohen Grad an Konservierung aufweist, wurde überprüft, ob orthologe Pit2-Proteine aus *U. hordei*, *S. reilianum* und *M. pennsylvanicum* die Funktion von UmPit2 im *U. maydis*-Mais-Pathosystem ersetzen können. Dabei zeigte lediglich SrPit2 das Potential, UmPit2 zumindest teilweise zu ersetzen, wobei auch hier keine vollständige Wiederherstellung der Virulenz erreicht werden konnte. Dieser Sachverhalt steht in Widerspruch zu Beobachtungen, die im Rahmen der Bachelorarbeit von Marlen Breuer erarbeitet wurden. Hierbei zeigte sich in Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen, dass einerseits UhPit2 und SrPit2 mit allen getesteten Proteasen (CP1A/B, CP2, XCP2 und CatB) interagieren, wodurch sie sich von UmPit2 unterscheiden, welches keine Interaktion mit CatB zeigte (Breuer, 2013). Für MpPit2 hingegen konnte mit keiner der getesteten Proteasen eine Interaktion nachgewiesen werden (Breuer, 2013). Aufgrund der Interaktion von UhPit2 und SrPit2 wäre in diesem Zusammenhang zu erwarten gewesen, dass sich diese Beobachtungen auch auf die *in vivo*-Funktion der getesteten Proteine auswirkt und sich in einem solchen Fall durch Komplementation des $\Delta pit2$ -Phänotyps geäußert hätte. Für MpPit2 besteht hierbei die Möglichkeit, dass zwar eine Interaktion mit den apoplastischen Zielproteasen stattfindet, diese jedoch zu schwach ist, um einen Effekt im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu erzielen. Andererseits könnte diese aber ausreichend sein, um *in planta* geringfügig zur Virulenz von *U. maydis* beizutragen. Abgesehen davon konnte keine Expression der in diesem Kontext getesteten Proteasen nachgewiesen werden, wenn gleichzeitig *mppit2* exprimiert wurde (Breuer, 2013). Somit könnte die nicht vorhandene Interaktion mit der Abwesenheit der getesteten Proteasen erklärt werden. Die einfachste Erklärung wäre jedoch, dass keine Interaktion der getesteten Proteasen mit MpPit2 stattfindet, folglich deren Aktivität nicht inhibiert und die durch die Proteasen ausgelöste Pflanzenabwehr nicht blockiert wird.

Des Weiteren sollte bedacht werden, dass Mais keine natürliche Wirtspflanze für *U. hordei* und *M. pennsylvanicum* darstellt (Begerow *et al.*, 2000; Laurie *et al.*, 2012) und *S. reilianum* neben Mais auch Sorghumhirse (*Sorghum bicolor*) befallen kann (Schirawski *et al.*, 2010). Dies legt nahe, dass die entsprechenden Pit2-Orthologe an die Proteasen ihrer jeweiligen Wirte adaptiert sind. SrPit2 könnte hierbei eher an die Proteasen aus Sorghumhirse, als an die von Mais angepasst sein, was sich schließlich dadurch äußert, dass die Effizienz dieses Effektors in Mais reduziert ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Proteine bzw. Bestandteile von Proteinen, die von Pilzen stammen, die nicht Mais als Wirtspflanze besiedeln, erkannt oder abgebaut werden und es dadurch zur Induktion von Abwehrreaktionen kommt. So könnten beispielsweise Proteasen, die zwar in Mais existieren, jedoch nicht in Gerste (*Hordeum vulgare*) oder Knöterich (*Polygonum lapathifolium*) für den Abbau von UhPit2 bzw. MpPit2 verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang konnte für beide Proteine mithilfe des PROSPER (*Protease specificity prediction server*)-Online-tools (<http://lightning.med.monash.edu.au/PROSPER/home.html>; Song *et al.*, 2012) eine potentielle Spaltstelle innerhalb der funktionellen Domänen identifiziert werden, die spezifisch für Metalloproteasen ist (Daten nicht gezeigt). Es wäre also denkbar, dass diese Proteine von apoplastisch lokalisierten Mais-Metalloproteasen adressiert und abgebaut werden, wodurch sie daran gehindert werden die Aktivität pflanzlicher Cysteinproteasen zu inhibieren. Folglich kommt es zu den gleichen Abwehrreaktionen, wie sie auch in SG200 Δ pit2-Infektionen auftreten und die Induktion der Tumorbildung unterbleibt. Umgekehrt käme es in anderen Pflanzen möglicherweise zur Erkennung von UmPit2. Dies könnte eventuell durch Expression von *umpit2* in der *U. hordei pit2*-Deletionsmutante, für die ein Virulenzverlust auf Gerste gezeigt werden konnte (D. Aßmann, G. Döhlemann, persönliche Mitteilung), überprüft werden.

Darüber hinaus könnten die im Falle von sowohl UhPit2, als auch SrPit2 gemachten Beobachtungen dadurch erklärt werden, dass diese im Gegensatz zu UmPit2 auch mit CatB interagieren (Breuer, 2013). Unter Umständen erfordert eine erfolgreiche Etablierung der biotrophen Interaktion die Aktivität von CatB, sodass die Protease in diesem Zusammenhang nicht blockiert werden darf. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die im Gegensatz zu UmPit2 nicht vorhandene Spezifität gegenüber den getesteten Zielproteinen auch auf weitere Proteasen auswirkt, deren Aktivität möglicherweise zur Infektion von Mais erforderlich ist. Eine

derartige Beobachtung konnte im Fall des einzelligen Parasiten *Giardia intestinalis* gemacht werden, welcher zur erfolgreichen Besiedelung des menschlichen Darms auf die Aktivität der Protease Trypsin angewiesen ist. Trypsin-Aktivität wird hierbei zur Aktivierung von Lektinen und einer damit einhergehenden Adhäsion an die Darmwand benötigt (Lev *et al.*, 1986). Auch in Pilzen existieren Lektine (Varrot *et al.*, 2013) und im Bereich pflanzenpathogener Pilze konnte am Beispiel von *M. oryzae* ein solches identifiziert werden, das in der frühen Phase der Infektion von Reispflanzen transkriptionell aktiviert wird (Koharudin *et al.*, 2011). Weiterhin scheinen Lektine auch in *U. maydis* zu existieren (U. Lahrmann, persönliche Mitteilung; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>), wodurch ein derartiger Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden kann. Außerdem wäre die Vermutung, dass CatB zur erfolgreichen Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion benötigt wird auch in Einklang mit den Beobachtungen, die im Zusammenhang mit CC9 gemacht wurden (siehe Abschnitt 3.1). Andererseits wurde jedoch für Cathepsine aus *N. benthamiana* und *A. thaliana* berichtet, dass diese in die Entstehung von programmiertem Zelltod involviert sind (Gilroy *et al.*, 2007; McLellan *et al.*, 2009). Die Tatsache jedoch, dass CatB durch UmPit2 nicht inhibiert wird, spricht dagegen, dass die Einleitung pflanzlicher Abwehr im Zuge der Besiedelung von Mais durch *U. maydis* in Abhängigkeit dieser Protease initiiert wird. In diesem Zusammenhang kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass CatB beispielsweise durch CP1 oder CP2 aktiviert wird und Pit2 somit indirekt die Aktivität von CatB unterbindet. Für humanes CatB etwa wurde berichtet, dass dieses unter anderem durch die Aktivität anderer Cysteinproteasen aktiviert wird (Podgorski und Sloane, 2003). Somit könnte ein derartiger Zusammenhang in Mais auch durchaus in Betracht gezogen werden.

3.4 PID14-Regionen aus Pit2-Orthologen verwandter Brandpilze sind nicht funktionell in UmPit2

Die Funktion der UmPID14 als Protease-Inhibitor in Verbindung mit der starken Diversifizierung der flankierenden Bereiche von Pit2 legten den Schluss nahe, dass die PID14-Region für die Inhibition der adressierten Cysteinproteasen verantwortlich ist, während der übrige Teil von Pit2 die Spezifität gegenüber den Zielproteinen determiniert. Dem entgegen spricht, dass die Expression von UhPID14 oder MpPID14 in Kombination mit UmPit2 im SG200 Δ pit2-Hintergrund nicht zu einer

Komplementation des Phänotyps führte. Lediglich die Integration von SrPID14 in UmPit2 führte zu einer teilweisen Wiederherstellung der Wildtypvirulenz, nicht jedoch das Vorhandensein der SrPID14 alleine. Darüber hinaus führte auch die Anwesenheit von UhPID14 oder MpPID14 alleine nicht zu einer nennenswerten Erhöhung der Tumorraten in Maispflanzen.

Diese Beobachtungen stehen im starken Gegensatz zu den Ergebnissen, die durch *in vitro*-Experimente erlangt wurden. Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen, synthetisch hergestellten Peptide der orthologen PID14-Regionen die Protease-Aktivität in apoplastischen Extrakten inhibierten. UhPID14 zeigte dabei eine ähnliche Aktivität wie UmPID14, während SrPID14 oder MpPID14 zu einer schwächeren, aber dennoch signifikanten Inhibition der getesteten Proteasen führten. Somit wäre zu erwarten gewesen, dass alle UmPit2-Chimären mit orthologer PID14-Region den Δ pit2-Phänotyp komplementieren können. Umgekehrt hätte man aufgrund der Ergebnisse aus den Infektionstests in diesem Zusammenhang erwartet, dass SrPID14 den stärksten Effekt erzielt, wenn auch der in den Protease-Aktivitätstests beobachtete Effekt durchaus auf die Situation übertragbar ist, dass die durch SrPID14 beobachtete schwächere Hemmung der Zielproteasen *in vitro* auch einen schwächeren Effekt *in planta* zur Folge hatte, wenn sich diese innerhalb von UmPit2 befand.

Die gemachten Beobachtungen für sämtliche PID14-Peptide und die Chimären bestehend aus UmPit2 und orthologen PID14-Regionen legen hierbei die Vermutung nahe, dass es, wie auch im Falle der nativen Pit2-Orthologe, zu einer Erkennung oder einem Abbau von Proteinen und damit einhergehend zur Induktion von Abwehrreaktionen kommt, wenn diese Bestandteile beinhalten, die aus Proteinen von Pathogenen stammen, die nicht Mais als Wirtspflanze besiedeln.

Für UhPID14 kann hierbei wiederum damit argumentiert werden, dass sowohl für UhPID14 alleine, als auch in Verbindung mit UmPit2 eine potentielle Erkennungsstelle für Metalloproteasen vorhergesagt werden kann (Daten nicht gezeigt). Der starke Inhibitions-Effekt des UhPID14-Peptids auf die getesteten Mais-PLCPs könnte in diesem Fall darauf beruhen, dass in den getesteten Fraktionen nur solche mit Cysteinprotease-Aktivität getestet wurden und diese möglicherweise keine Metalloproteasen beinhalteten, wodurch es auch nicht zu einem Abbau des getesteten Peptids kommen konnte. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, Fraktionen mit Metalloprotease-Aktivität zu identifizieren und deren Einfluss auf die

Stabilität von UhPID14 bzw. UhPID14-beinhaltende Proteine, inklusive UhPit2, zu testen. Auch eine Wechselwirkung mit weiteren Proteinen aus anderen Fraktionen kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Somit wäre es eventuell auch lohnenswert, zukünftige Experimente auch mit nicht-fraktionierter, apoplastischer Flüssigkeit durchzuführen.

Des Weiteren können die in den Protease-Aktivitätstests beobachteten Effekte im Allgemeinen möglicherweise nicht vollständig auf die *in planta*-Situation übertragen werden, da für die durchgeführten Experimente die Proteine des Gesamt-Apoplasten isoliert wurden. Pit2 jedoch lokalisiert überwiegend in der biotrophen Interaktionszone (Doehlemann *et al.*, 2011) dessen spezifische Proteinzusammensetzung sich vermutlich von der des Gesamt-Apoplasten unterscheidet.

Zusätzlich konnte im Zuge der Bachelor-Arbeit von Marlen Breuer gezeigt werden, dass sämtliche Chimären von orthologen Pit2-Proteinen in Kombination mit der UmPID14 die Funktion von UmPit2 zumindest teilweise ersetzen können (Breuer, 2013). Zusammen mit den Ergebnissen für Chimären aus UmPit2 kombiniert mit der UhPID14, SrPID14 oder MpPID14 zeigt dies, dass die Funktion von Pit2 in Mais überwiegend durch die jeweilige PID14 determiniert wird, während dem übrigen Teil des Proteins eine geringere Bedeutung diesbezüglich zuzuschreiben ist. Da jedoch keine Wiederherstellung der Virulenz auf Wildtyp-Niveau erreicht werden konnte, kann auch weiterhin eine Rolle übriger Proteinbestandteile für die Aktivität von Pit2 in Mais nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich sollte auch die Faltung der jeweiligen Proteine nicht außer Acht gelassen werden. Durch die Kombination aus orthologem Pit2 mit UmPID14 besteht die Möglichkeit, dass die UmPID14-Region schlechter zugänglich ist, als dies im nativen Umfeld der Fall ist. Folglich käme es zu einer weniger effizienten Bindung der Zielproteasen.

Weiterhin wurde durch Komplementationsstudien die Fragestellung adressiert, welche Reste in Pit2 genau den Unterschied zwischen Kompatibilität im Falle von UmPit2 und der im Falle von UmPit2-UhPID14 beobachteten Inkompatibilität ausmachen. Hierfür wurden mutierte UmPit2-Versionen im SG200 Δ pit2-Hintergrund exprimiert, bei denen die sich zwischen UhPit2 und UmPit2 unterscheidenden Reste innerhalb der PID14-Region teilweise durch die der UhPID14 ersetzt wurden. Aufgrund der erlangten Ergebnisse kann jedoch nicht abschließend gesagt werden, welche Reste hierbei tatsächlich essentiell sind. Jedoch konnte gezeigt werden,

dass die Reste N46, G52 und T54 offenbar wichtiger für die Funktion von Pit2 in der Interaktion von *U. maydis* mit Mais sind, als die Reste W50 und F53. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, sollten weitere mutierte Versionen hergestellt werden, in denen die entsprechenden Reste einzeln bzw. in anderen Kombinationen auf ihren Effekt *in planta* untersucht werden.

3.5 Pit2-ähnliche Proteine in Bakterien

Im Rahmen einer BLAST-Analyse unter Verwendung der UmPID14-Sequenz als *query* konnten bakterielle Proteine identifiziert werden, die Sequenzbereiche mit starker Ähnlichkeit zur PID14-Region von *U. maydis* Pit2 aufweisen. Interessanterweise handelt es sich bei allen identifizierten Bakterien um Bodenbakterien. Weiterhin sind besonders Actinobakterien, zu denen unter anderem die Gattungen *Amycolatopsis* und *Streptomyces* gehören, sowie Proteobakterien, denen auch die Betaproteobakterien der Gattung *Burkholderia* angehören, in der Wurzel-Endosphäre der Modellpflanze *A. thaliana* in einem hohen Anteil vorzufinden (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012). Ähnlich ist dies in den Wurzeln von Maispflanzen, wo insbesondere Actinobakterien identifiziert werden konnten (Prischl *et al.*, 2012), sowie Bakterien der Gattung *Burkholderia* sp. (McInroy und Kloepper, 1995). Da endophytische Bakterien generell als nicht-pathogen angesehen werden (Turner *et al.*, 2013), ist es unwahrscheinlich, dass Pit2-ähnliche Proteine von diesen in einem negativen Kontext, wie etwa der Ausbildung von Krankheitssymptomen, benötigt werden. Jedoch müssen auch mutualistische Organismen zur erfolgreichen Besiedelung der Wirtspflanze in der Lage sein, die grundlegenden Mechanismen des pflanzlichen Immunsystems zu überwinden (Oldroyd, 2013). Dies könnte u. a. mit Hilfe Pit2-ähnlicher Proteine ermöglicht werden.

Zusätzlich könnte durch Pit2-vermittelte Protease-Inhibition die SA-abhängige Abwehr blockiert werden, um die Besiedelung der Pflanzenwurzel durch weitere Endophyten zu gewährleisten, die für die Pflanze wiederum von Vorteil sein können. So konnte gezeigt werden, dass in der Modellpflanze *A. thaliana* die Induktion SA-vermittelter Abwehr eine reduzierte Diversität von Endophyten zur Folge hat, wohingegen sich bei Pflanzen mit defizienter JA-abhängiger Abwehr das Gegenteil zeigte (Kniskern *et al.*, 2007).

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Zeitpunkt der transkriptionellen Aktivierung *pit2*-ähnlicher Gene aus den entsprechenden Bakterien zu überprüfen.

Dies könnte durch quantitative Real-Time PCR aufgeklärt werden, was unter Zuhilfenahme von RNA, die von Proben aus besiedeltem Wurzelmaterial verschiedener Zeitpunkte stammt, geschehen sollte.

In den Experimenten mit einem synthetischen Peptid der PID14 aus *Streptomyces* sp. AA4 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität apoplastischer Proteasen aus Maisblättern partiell inhibiert werden kann. Dies geschah jedoch nicht in dem Maße, wie es durch Zugabe von UmPID14 der Fall war. Apoplastische Proteasen aus Wurzeln wären für diese Experimente angebrachter gewesen, da diese das natürliche Ziel eines Wurzel-Endophyten-Proteins darstellen. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass sich die apoplastische Flüssigkeit bezüglich der Proteasen-Zusammensetzung in Wurzeln und Blättern voneinander unterscheidet. Hinweise für eine unterschiedliche Cysteinproteasen-Zusammensetzung in Wurzeln zeigten sich bereits in vorläufigen Experimenten mit apoplastischer Flüssigkeit. Einerseits ist hierbei die Gesamtzahl der Fraktionen, die eine Cysteinprotease-Aktivität aufweisen gegenüber denen im Blatt stark erhöht und zudem ist auch die gemessene Cysteinprotease-Aktivität deutlich höher als im Blatt (K. van der Linde, S. Ziemann, persönliche Mitteilung). Eine massenspektrometrische Analyse dieser Proteasen steht jedoch noch aus (K. van der Linde, S. Ziemann, persönliche Mitteilung).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die StrepPID14 die Funktion der UmPID14 innerhalb von Pit2 nicht ersetzen kann. In Anbetracht der Tatsache, dass auch keine der übrigen, getesteten PID14-Regionen innerhalb von Pit2 im *U. maydis*-Mais-System funktionell war, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Hinzu kommt, dass die hier verwendete Sequenz aus einem Bodenbakterium stammt, was es, wie auch zuvor bereits angesprochen, wahrscheinlicher macht, dass die entsprechende Region auf die Inhibition von Wurzelproteasen spezialisiert ist. Somit könnte ein sich unterscheidendes Interaktionsspektrum der Grund für die gemachten Beobachtungen sein. Außerdem ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar, ob *Streptomyces* AA4 überhaupt Mais als Wirtspflanze besiedeln kann.

Weitere zukünftige Experimente zur Untersuchung der Besiedelung von Maiswurzeln durch Bakterien und das Vorhandensein Pit2-ähnlicher Proteine schließen die Erfassung des Mais-Wurzel-Mikrobioms ein. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem Institut für angewandte Mikrobiologie in Gießen (Prof. Dr. Dr. Peter Kämpfer, Dr. Stefanie Glaeser) bereits Bakterien aus Wurzeln von Maispflanzen isoliert die unter Freilandbedingungen kultiviert wurden.

Hierbei wird derzeit per 16s-RNA-Sequenzierung eine Bestimmung der darin enthaltenen Bakterien vorgenommen.

Die Identifikation Pit2-ähnlicher Proteine könnte anschließend durch Genomsequenzierung einzelner, darin enthaltener Bakterien-Stämme erfolgen. Ein weiterer Ansatz wäre eine kontrollierte Besiedelung von Maiswurzeln unter sterilen Bedingungen und anschließender *in situ* Hybridisierung unter Verwendung Fluoreszenz-markierter DNA-Sonden. Dies wird üblicherweise zur Identifizierung einzelner Gruppen innerhalb einer Gemeinschaft verschiedener Gruppen auf Basis der Hybridisierung mit 16s-RNA vorgenommen (Eickhorst und Tippkötter, 2008), kann jedoch auch zur Identifizierung spezifischer Gene verwendet werden (Zwirgmaier *et al.*, 2004). Da die einzelnen bakteriellen Sequenzen, die für PID14-Regionen kodieren, unbekannt sind, könnte man hierbei degenerierte Oligonukleotid-Sonden zur Identifizierung verwenden.

Ein biochemischer Ansatz wäre die Durchführung direkter Inhibitionsexperimente mit Maisproteasen und Kulturüberständen von Bakterienflüssigkulturen der aus Maiswurzeln isolierter Bakterien. Eine Schwierigkeit hierbei könnte jedoch sein, dass die Transkription vieler Gene pflanzenassoziierter Bakterien erst pflanzenabhängig induziert wird (Mark *et al.*, 2005). Somit müsste man möglicherweise die Expression *pit2*-ähnlicher Gene *in vitro* zunächst induzieren. Dies könnte beispielsweise durch Verwendung von Wurzel-Exudaten geschehen (Mark *et al.*, 2005).

3.6 Die Bedeutung von Pit2 für die Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr

Der pflanzliche Apoplast im Allgemeinen stellt eine Art „molekulares Schlachtfeld“ dar, wobei durch Aktivierung bzw. Inaktivierung von Wirtskomponenten zwischen Kompatibilität und Resistenz entschieden wird. Pflanzenpathogene treten hierbei einer Vielzahl pflanzlicher Enzyme und Inhibitoren entgegen, die die Besiedelung des Wirtes erschweren. Beispiele hierfür sind einerseits pflanzliche Proteine, die pathogeneigene Enzyme wie etwa Xylanasen oder Polygalacturonasen inhibieren (Misas-Villamil und van der Hoorn, 2008). Andererseits existiert eine Vielzahl pflanzlicher Enzyme, die mit der Entstehung pflanzlicher Immunität assoziiert sind, wobei an dieser Stelle Glucanasen und Proteasen als Beispiele genannt werden können. Diese wiederum stellen bedeutungsvolle Ziele von Inhibitoren aus pflanzenpathogenen Organismen dar (Misas-Villamil und van der Hoorn, 2008).

Einer der ersten Proteaseinhibitoren, der in diesem Zusammenhang identifiziert wurde ist das Kazal-ähnliche Protein EPI1 aus *P. infestans*, das die Aktivität von Subtilisin A, sowie die der Subtilisin-ähnlichen apoplastischen Serinprotease P69B aus Tomate inhibieren kann (Tian *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde auch für den Kazal-ähnlichen Effektor EPI10 aus *P. infestans* von einer Inhibition der beiden Serinproteasen durch diesen berichtet (Tian *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass essentielle Komponenten des pflanzlichen Immunsystems die Ziele unterschiedlicher Effektoren darstellen können, um eine erfolgreiche Immunsuppression sicherzustellen.

Besonders hervorzuheben ist auch die Rolle Abwehr-assoziiierter Cysteinproteasen. Wie bereits in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Systemen gezeigt werden konnte, ist deren Inhibition durch Effektoren pflanzenpathogener Organismen ein essentieller Schritt zur Etablierung einer biotrophen Interaktion. Die Tomaten-Cysteinprotease RCR3 beispielsweise stellt das Ziel von Effektoren aus mindestens drei verschiedenen Organismen dar: Avr2 aus *C. fulvum*, EPIC1 und EPIC2B aus *P. infestans* und VAP1, der von dem Nematoden *Globodera rostochiensis* sekretiert wird (Rooney *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2007; van Esse *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009; Lozano-Torres *et al.*, 2012). Eine weitere Protease, für die ein Zusammenhang mit der Entstehung pflanzlicher Immunität gezeigt werden konnte ist die apoplastische Cysteinprotease C14 aus *N. benthamiana*. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Beispielen wird diese jedoch nicht direkt inhibiert. Vielmehr wird deren Sekretion in den Apoplasten durch den *P. infestans* Effektor Avrblb2 verhindert, was wiederum der Virulenz des Pathogens förderlich ist (Bozkurt *et al.*, 2011).

Weiterhin wird die Notwendigkeit der Inhibition Abwehr-assoziiierter PLCPs auch anhand des dramatischen Phänotyps der *pit2*-Deletionsmutante deutlich, der mit dem Verlust der Inhibition apoplastischer PLCPs einhergeht. Zusätzlich deutet dies darauf hin, dass offenbar kein weiterer Effektor aus *U. maydis* in der Lage ist, die Funktion von Pit2 als Protease-Inhibitor zu ersetzen, obwohl auch für die beiden *U. maydis* Effektoren Pep1 und Tin3 gezeigt werden konnte, dass diese die Aktivität apoplastischer PLCPs inhibieren können (Herrberger, 2012; Neidig, 2013). Hierbei sollte nicht vernachlässigt werden, dass die Inhibition pflanzlicher PLCPs durch Pit2 nicht nur die Immunreaktion der Pflanze unterdrückt, sondern auch weitere, durch *U.*

maydis sekretierte Proteine vor Degradation durch Cysteinproteasen in der biotrophen Interaktionszone schützt.

Ein weiterer Sachverhalt, der die Relevanz von Pit2 für die Interaktion von Pathogenen mit ihrer Wirtspflanze unterstreicht, ist die Tatsache, dass sowohl die *pit2*-Deletionsmutante in *U. hordei*, als auch in *S. reilianum* stark in ihrer Virulenz eingeschränkt sind (Persönliche Mitteilung, G. Döhlemann, D. Aßmann, G. Schweizer). Dies zeigt, dass die Anwesenheit von Pit2 auch für andere Brandpilze zur Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion mit ihrer jeweiligen Wirtspflanze erforderlich ist. Somit stellt sich die Frage, inwiefern die Modulation apoplastischer PLCPs durch Effektoren wie etwa Pit2 oder endogene Inhibitoren wie CC9 (van der Linde *et al.*, 2012a) auch essentiell ist für die Infektion von Pflanzen durch hemibiotrophe oder nekrotrophe Pathogene. Hinweise für einen derartigen Zusammenhang konnten durch Analyse der Genomsequenzen der beiden hemibiotrophen Oomyceten *Phytophthora sojae* und *Phytophthora ramorum*, sowie des nekrotrophen Oomyceten *Pythium ultimum* erlangt werden, deren Genome alle die Existenz von Genen, die für potentielle Cysteinprotease-Inhibitoren kodieren, aufweisen (Tyler *et al.*, 2006; Lévesque *et al.*, 2010).

Hierarchisch gesehen können Effektoren in *core*-Effektoren und Organ-spezifische Effektoren unterteilt werden. *core*-Effektoren haben hierbei die Aufgabe, grundlegende Komponenten des pflanzlichen Immunsystems dahingehend zu modulieren, dass eine Infektion durch das Pathogen überhaupt erst ermöglicht wird, während Organ-spezifische Effektoren in Abhängigkeit des besiedelten Pflanzenorgans benötigt werden (Skibbe *et al.*, 2010; Djamei und Kahmann, 2012; Doehlemann und Hemetsberger, 2013). Pit2 ist dabei der „Klasse“ der *core*-Effektoren zuzuordnen, da es essentiell ist zur Unterdrückung einer Komponente der basalen Immunantwort der Pflanze. Bei einer weiteren Aufteilung der *core*-Effektoren wäre Pit2 hierbei denen der zweiten Stufe zuzuordnen, da es im Gegensatz zu Pep1, welches als *core*-Effektor der ersten Stufe unmittelbar zur Penetration der Pflanze benötigt wird (Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012), erst danach zur Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion erforderlich ist (Doehlemann *et al.*, 2011).

3.7 Ausblick

Zur Überprüfung der in dieser Arbeit gemachten Aussagen sollte zunächst die Sekretion der nativen Pit2-Orthologe, sowie der verwendeten Chimären experimentell validiert werden. Zwar konnte dies bereits mikroskopisch bestätigt werden, es war jedoch bislang nicht möglich, auch immunologische Nachweise zu erbringen (Daten nicht gezeigt). Somit besteht weiterhin das Risiko, dass die Fluoreszenz-Signale auch nur mCherry alleine darstellen könnten, wenn der Rest des Proteins zwar gebildet, jedoch z. B. aufgrund unzureichender Stabilität oder inkorrekt Faltung abgespalten wird. Derartige Beobachtungen konnten am Beispiel Affinitäts-tag-markierter, apoplastischer Effektoren aus *C. fulvum* bei der Infektion von Tomate gemacht werden (van Esse *et al.*, 2006). Eine Möglichkeit dafür wäre es, die Bildung und Sekretion der verschiedenen nativen Pit2-Varianten sowie -Chimären jeweils mit einem HA-tag in axenischer Kultur nachzuweisen. Dafür könnten die zu untersuchenden Proteine unter Verwendung des konstitutiven *otef*-Promoters durch Spordien sekretiert werden oder man könnte sich der Sekretion b-abhängiger Filamente bedienen, wobei in diesem Fall auch ein in b-Filamenten induzierter Promoter wie z. B. der von *stp1* verwendet werden könnte (Schipper, 2009).

Des Weiteren stellt die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Inhibition apoplastischer PLCPs durch Pit2 einen essentiellen Bestandteil zukünftiger Arbeiten dar. Schlüsselexperimente die zur Aufklärung dieser Fragestellung beitragen beinhalten einerseits weitere Untersuchungen zur Identifikation der für die spezifische UmPit2-Protease-Interaktion essentiellen Reste im Rahmen von Mutagenesestudien. Auch die Strukturaufklärung von UmPit2 und der Pit2-Orthologe aus den verwandten Brandpilzen, möglichst als Proteinkomplexe mit den jeweilig inhibierten Proteasen wäre hilfreich. Dies würde Auskunft über die räumliche Lokalisation der PID14-Region, sowie den Einfluss des jeweiligen Gesamtproteins auf die Exposition der funktionellen Domäne geben. Dies erfordert jedoch die heterologe Herstellung dieser Proteine, was bislang in *E. coli* nicht gelungen ist (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems, wie z. B. *Pichia pastoris*, was auch im Falle des *C. fulvum* Effektors Ecp6 zum Erfolg führte (de Jonge *et al.*, 2010), könnte dies jedoch ermöglichen. Ferner würde dadurch auch die Durchführung weiterer *in vitro*-Tests mit apoplastischen Mais-

PLCPs, sowie mit individuellen, heterolog in *N. benthamiana* hergestellten Proteasen ermöglicht werden.

Auch zusätzliche Experimente zur Interaktion von Pit2-Orthologen und -Chimären mit Mais-PLCPs wären von großem Interesse, um weitere Erkenntnisse über die Spezifität der verwendeten Pit2-Varianten zu erlangen. Zur Erfassung schwacher oder transienter Protein-Protein-Interaktionen, wäre es dabei sinnvoll, neben Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen, auch weitere Methoden, wie z. B. eine eigens für schwache Protein-Protein-Interaktionen entwickelte *Far-Western*-Methode (Sato *et al.*, 2011) hinzuzuziehen. Des Weiteren wurde auch für BiFC eine sehr hohe Sensitivität beschrieben (Morell *et al.*, 2007) und auch als Nachweis der Interaktion des *U. maydis* Effektors Pep1 mit der Maisperoxidase POX12 konnte diese Methode in modifizierter Form bereits erfolgreich angewendet werden (Hemetsberger *et al.*, 2012). Weitere Möglichkeiten zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion wären Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder CoIP, die schließlich zur Bestätigung zuvor gemachter Beobachtungen genutzt werden könnten.

Zusätzlich sollte auch die Identifikation SA-induzierter Proteasen im *U. hordei*-Gerste-System und deren Erforschung im Hinblick auf die Interaktion mit den verschiedenen Pit2-Varianten in Betracht gezogen werden. Durch Vergleiche dieses Systems mit dem *U. maydis*-Mais-System, sowohl auf genetischer, als auch auf biochemischer Ebene in Kombination mit Interaktionsstudien, könnten weitere Erkenntnisse über die Konservierung der Pit2-Funktion, dessen Wirtsspezifität und die Relevanz von Pit2 für die Unterdrückung der pflanzlichen Immunabwehr durch phytopathogene Pilze erlangt werden.

Nicht zuletzt stellt Untersuchung der Rolle Pit2-ähnlicher Proteine in Wurzel-assoziierten Bakterien eine zukünftige Herausforderung dar, um ein tieferes Verständnis über die generelle Bedeutung von Pit2 bzw. Pit2-ähnlicher Proteine für die Interaktion von Pflanzen mit Mikroorganismen zu erlangen. Nach Erfassung des Mais-Wurzel-Mikrobioms sollte dabei die Identifikation solcher Proteine, etwa durch Genomsequenzierung oder *in situ*-Hybridisierung (siehe Abschnitt 3.5) und deren anschließende Charakterisierung im Hinblick auf das Potential, Cysteinproteasen zu inhibieren, im Mittelpunkt stehen.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Alle im Laufe dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders vermerkt, von der Qualität *p. a.* und stammen vorwiegend von den Firmen Difco (Augsburg), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (2002) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Soweit notwendig wurden diese vor Verwendung für 5min bei 121°C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2µm; Merck, Darmstadt) sterilfiltriert.

4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion[®] *Hot Start High-Fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn), oder der, Taq-Polymerase enthaltende RedMix (Bioline, Lucken-walde) verwendet. Die Ligation von DNA-Molekülen wurde mit der T4-DNA Ligase (Thermo Scientific, Bonn) durchgeführt. Für den enzymatischen Abbau von RNA wurde RNase A (Serva, Heidelberg) verwendet. Enzymatischer Abbau von pilzlichen Zellwänden erfolgte mit Novozym 234 (Novo Nordisc; Kopenhagen, Dänemark). Antikörper wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Cell Signaling Technology (Danver, USA) bezogen. Eine detaillierte Auflistung verwendeter Antikörper findet sich in Abschnitt 4.6.2.

4.1.4 Verwendete Kits

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten, sowie zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das Wizard[®] SV Gel und PCR *Clean-Up System* (Promega, Mannheim) verwendet. Für die Aufreinigung von Plasmiden wurde das QIAprep[®] Mini Plasmid Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Insertion von Punktmutationen in Plasmide erfolgte mit Hilfe des QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit

(Stratagene, LaJolla/USA). Zur Digoxigenin-Markierung von PCR-Produkten wurde das DIG High Prime Kit (Roche, Mannheim). Spezielle Kits sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

4.2 Zellkultivierung

4.2.1 Kultivierungs- und Anzuchtmedien

Zur Kultivierung von Mikroorganismen wurden die in Tab. 3 aufgeführten Medien verwendet. Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, vor Verwendung für 5min bei 121°C autoklaviert.

Tab. 3: Zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendete Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anmerkungen
dYT (-Agar)	1,6% (w/v) Trypton 1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl (1,5% (w/v) Bacto Agar)	in H ₂ O _{bid.}
YEPS _{light}	1% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Pepton 1% (w/v) Saccharose	in H ₂ O _{bid.}
Potato-Dextrose-Agar (PD)	2,4% (w/v) <i>Potato-Dextrose Broth</i> 2% (w/v) Bacto Agar	in H ₂ O _{bid.}
PD-Charcoal-Agar	Wie PD, jedoch zusätzlich 1,0% (w/v) Aktivkohle	in H ₂ O _{bid.}
NSY-Glycerin	0,8% (w/v) <i>Nutrient Broth</i> 0,1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) Saccharose 69,6% (v/v) Glycerin	in H ₂ O _{bid.}
YPDA (-Agar)	2% (w/v) Pepton 1% (w/v) Hefeextrakt 0,003% (w/v) Adenin-Hemisulfat (2% (w/v) Bacto Agar)	in H ₂ O _{bid.} , pH 6,5, Zugabe von 2% (w/v) Glucose nach Autoklavieren
YPDS-Agar	2% (w/v) Pepton 1% (w/v) Hefeextrakt 2% Glucose 1M Sorbitol 2% (w/v) Bacto Agar	in H ₂ O _{bid.}
SD (-Agar)	0,67% (w/v) <i>Yeast nitrogen base</i> ohne Aminosäuren 0,06% (w/v) <i>Dropout Solution</i> (-Ade, -His, -Leu, -Trp) (2% (w/v) Bacto Agar)	in H ₂ O _{bid.} , pH 5,8, Zugabe von 2% (w/v) Glucose nach Autoklavieren

4.2.2 Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens*

E. coli- und *A. tumefaciens*-Bakterien wurden in dYT-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) und 200rpm kultiviert. Zur Selektion wurden bei Bedarf die in Tab. 4 aufgelisteten Antibiotika in den angegebenen Mengen verwendet. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Tab. 4: Für die Kultivierung von *E. coli* und *A. tumefaciens* verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin (Amp)	100
Kanamycin (Kan)	40
Chloramphenicol (Clm)	34
Rifampicin (Rif)	40
Streptomycin (Strp)	100
Gentamicin (Gent)	50
Tetracyclin (Tet)	25

4.2.3 Kultivierung von *U. maydis*

Als Standardmedium zur Kultivierung von *U. maydis*-Flüssigkulturen diente YEPS_{light}-Flüssigmedium (modifiziert nach Tsukuda *et al.*, 1988). Die Anzucht erfolgte bei 28°C und 200rpm. Als Festmedium diente *Potato*-Dextrose-Agar, welches ggf. zur Selektion mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Carboxin (Cbx) versetzt wurde. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurde einer dicht gewachsenen $\bar{u}N$ (über Nacht)-Kultur 50% NSY-Glycerin hinzugefügt und diese dann bei -80°C gelagert.

4.2.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae*-Stämmen wurde im Falle des Wildtyps (AH109) YPD-Medium verwendet. Zur Selektion transformierter *S. cerevisiae*-Stämme wurde SD-Medium, dem Adenin, Histidin, Leucin und/oder Tryptophan fehlte, verwendet. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

4.2.5 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde in einem Novaspec II Photometer (Pharmacia Biotech/GE Lifesciences, München) bei 600nm ($OD_{600\text{nm}}$) bestimmt. Um

eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die OD_{600nm} des entsprechenden Kulturmediums verwendet. Bei *U. maydis* und *S. cerevisiae* entspricht eine OD_{600nm} von 1 etwa einer Zellzahl von $1-5 \times 10^7$ Zellen. Bei *E. coli* und *A. tumefaciens* entspricht dieser Wert etwa 1×10^9 Bakterienzellen.

4.3 Verwendete Stämme, Oligonukleotide und Plasmide

4.3.1 *E. coli*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme und deren Verwendungszweck sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm [Genotyp]	Verwendung	Referenz/Bezug
K-12 DH5 α [F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA- argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Grant <i>et al.</i> , 1990/Gibco/BRL, Eggenstein)
BL21(DE3)pLysS [F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3) pLysS(cm ^R)]	Heterologe Herstellung von Proteinen	Novagen/Merck, (Darmstadt)
Tuner(DE3)pLysS [F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm lacY1(DE3) pLysS (Cam ^R)]	Heterologe Herstellung von Proteinen	Novagen/Merck, (Darmstadt)

4.3.2 *A. tumefaciens*-Stämme

Zur transienten Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana* wurde *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) verwendet, der eine chromosomale Rif-Resistenz besitzt. Außerdem enthält dieser Stamm das Ti-Plasmid pMP90, das die für den DNA-Transfer nötigen *vir*-Gene, jedoch eine ansonsten unfunktionelle T-DNA-Region enthält und Gent-Resistenz vermittelt. Außerdem enthält der verwendete Stamm eine auf dem Ti-Helferplasmid lokalisierte Tet-Resistenz. Durch dieses wird *in trans* die Replikation der Plasmide in *A. tumefaciens* vermittelt.

4.3.3 *S. cerevisiae*-Stämme

Als Ausgangsstamm für sämtliche in dieser Arbeit aufgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen wurde der Hefestamm AH109 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye,

Frankreich) verwendet. Dieser Stamm besitzt Auxotrophien für Tryptophan, Alanin, Histidin und Leucin.

4.3.4 *U. maydis*-Stämme

Die im Verlauf dieser Arbeit hergestellten *U. maydis*-Stämme, sowie deren Beschreibung sind in Tab. 10 des Anhang zu dieser Arbeit aufgeführt. Zur Integration von Genen in den *ip*-Locus (*sdh2*) wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ipR*) tragen (Broomfield und Hargreaves, 1992). Diese Plasmide wurden zunächst mit *SspI* linearisiert und über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven, *ip*-Allel (*ipS*) in das Genom von *U. maydis* eingebracht (siehe Abschnitt 4.4.3). Resultierende Stämme wurden durch Southern-Blot-Analysen (siehe Abschnitt 4.5.3.2) verifiziert. In Stämmen, die eine Insertion im *ip*-Locus tragen, wurde das entsprechende Konstrukt, falls nicht anders gekennzeichnet, in einfacher Kopie inseriert. Die Plasmide zur Herstellung der Stämme sind in Kapitel 4.3.6 beschrieben.

4.3.5 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Martinsried) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und sind in Tab. 11 des Anhangs zu dieser Arbeit aufgeführt.

4.3.6 Plasmide

4.3.6.1 Plasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen

pGBKT7 (Clontech, Mountain View, USA)

Plasmid, das für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen verwendet wurde (*bait*-Vektor). Hierbei wurde es sowohl als Kontrollplasmid (Leervektor), als auch als Ausgangsplasmid für Genfusionen von verschiedenen Pit2-Varianten mit der integrierten Gal4-DNA-Bindedomäne und einem cMyc-*tag* eingesetzt. Es vermittelt Kan-Resistenz und enthält den TRP1 Auxotrophiemarker.

pGBKT7-UmPit2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit Um01375. Das dafür kodierende Gen wurde durch die Primer Oma100 und OGU85 amplifiziert und über *NcoI* und *EcoRI* in pGBKT7 kloniert.

pGBKT7-UmPit2^{Δ44-57} (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit Um01375, bei dem die Region, die für die Aminosäuren 44-57 kodiert, deletiert wurde. Das Plasmid wurde durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma31 und Oma32 mit Plasmid pGBKT7-UmPit2 als *Template* und anschließender *Bluntend*-Ligation hergestellt.

pGBKT7-UmPit2^{Δ49-53} (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit um01375, bei dem die Region, die für die Aminosäuren 49-53 kodiert, deletiert wurde. Das Plasmid wurde durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma33 und Oma34 mit Plasmid pGBKT7-UmPit2 als *Template* und anschließender *Bluntend*-Ligation hergestellt.

pGBKT7-UmPit2^{mut49-53} (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit um01375, bei dem die Region, die für die Aminosäuren 49-53 kodiert, mutiert wurde. Das Plasmid wurde durch gezielte Mutagenese (siehe Abschnitt 4.5.2.4) unter Verwendung des Primers Oma90 mit Plasmid pGBKT7-UmPit2 als *Template* hergestellt.

pGADT7 (Clontech, Mountain View, USA)

Plasmid, das für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen verwendet wurde (*prey*-Vektor). Hierbei wurde es sowohl als Kontrollplasmid (Leervektor), als auch als Ausgangsplasmid für Genfusionen von verschiedenen Pit2-Varianten mit der integrierten Gal4-Aktivierungsdomäne und einem HA-*tag* eingesetzt. Es vermittelt Amp-Resistenz und enthält den Leu2 Auxotrophiemarker.

pGADT7-CP2_{full} (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001105479. Das Gen wurde durch die Primer STO16 und STO17 amplifiziert und über *NdeI* und *BamHI* in pGADT7 kloniert.

pGADT7-CP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001105479. Das Gen wurde durch die Primer ODA65 und ODA66 amplifiziert und über *NdeI* und *BamHI* in pGADT7 kloniert.

pGADT7-CP2^{Mut} (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001105479, bei dem die Region, die für die Aminosäuren des aktiven Zentrums kodiert, mutiert wurde. Das Plasmid wurde durch gezielte Mutagenese (siehe Abschnitt 4.5.2.4) unter Verwendung der Primers Oma3, Oma4 und Oma5 mit Plasmid pGADT7-CP2 als *Template* hergestellt.

pGADT7-CP1A (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001148706. Das Gen wurde durch die Primer Oma42 und Oma43 amplifiziert und über *NdeI* und *BamHI* in pGADT7 kloniert.

pGADT7-CP1B (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001149658. Das Gen wurde durch die Primer Oma46 und Oma47 amplifiziert und über *NdeI* und *BamHI* in pGADT7 kloniert.

pGADT7-XCP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001149806. Das Gen wurde durch die Primer Oma52 und Oma53 amplifiziert und über *NdeI* und *BamHI* in pGADT7 kloniert.

pGADT7-CatB (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit NP_001150152. Das Gen wurde durch die Primer Oma49 und Oma50 amplifiziert und über *NdeI* und *BamHI* in pGADT7 kloniert.

4.3.6.2 Plasmide zur Generierung von stabilen *U. maydis*-Mutanten**P123** (Aichinger *et al.*, 2003)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators. Ausgangsplasmid zur Herstellung von Komplementationskonstrukten. Für sämtliche auf diesem Plasmid basierenden Konstrukte gilt, dass diese für Transformation von *U. maydis* durch Restriktionsverdau mit *SspI* im *cbx*-Gen linearisiert und anschließend durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus inseriert werden können. Es vermittelt Amp-Resistenz und komplementiert Cbx-Resistenz.

p123-Ppit2

Enthält Promotor von um01375. Dahinter befinden sich diverse Restriktionsschnittstellen für Klonierungszwecke. Herstellung des Plasmids durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma104 und Oma105, restriktionsverdau mit *Xma*I und anschließender Ligation.

p123-Ppit2-Pit2SP

Enthält Promotor von um01375 inklusive dessen Signalpeptid. Als *Insert* wurden die Primer Oma107 und Oma108, welche exakt komplementär zueinander sind, gemischt, denaturiert und anschließend durch Abkühlen hybridisiert. Das auf diese Weise hergestellte DNA-Fragment wurde dann über *Sac*II und *Xma*I in p123-Ppit2 kloniert.

p123-Ppit2-mCherry

Enthält Promotor von um01375 fusioniert zu dem *mCherry*-Gen. Dazwischen befinden sich diverse Restriktionsschnittstellen für Klonierungszwecke. Herstellung des Plasmids durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma104 und Oma106, Restriktionsverdau mit *Xma*I und anschließender Ligation.

p123-Ppit2-pit2SP-mCherry

Enthält Promotor von um01375 inklusive dessen Signalpeptid fusioniert zu dem *mCherry*-Gen. Als *Insert* wurden die Primer Oma107 und Oma108, welche exakt komplementär zueinander sind, gemischt, denaturiert und anschließend durch Abkühlen hybridisiert. Das auf diese Weise hergestellte DNA-Fragment wurde dann über *Sac*II und *Xma*I in p123_Ppit2-mCherry kloniert.

p123-Ppit2-pit2SP-mCherry-HA (Hergestellt von M. Breuer)

Enthält Promotor von um01375 inklusive dessen Signalpeptid fusioniert zu dem *mCherry*-Gen inklusive *HA-tag*. Herstellung des Plasmids durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma150 und Oma171, Restriktionsverdau mit *Not*I und anschließender Ligation.

p123-Ppit2-UmPit2 (Doehlemann *et al.*, 2011)

Enthält um01375 unter Kontrolle des nativen Promotors und des *nos*-Terminators.

p123-Ppit2-UmPit2-mCherry (Doehlemann *et al.*, 2011)

Plasmid, welches zur mikroskopischen Lokalisierung von UmPit2 generiert wurde. Hierbei wurde die Sequenz von um01375 an die von mCherry fusioniert, sodass bei Expression, unter Kontrolle des nativen Promotors und des *nos*-Terminators, schließlich N-terminal an mCherry fusioniertes Pit2 gebildet wird.

p123-Ppit2-UmPit2^{Δ44-57} (Mueller *et al.*, 2013)

Enthält das um01375 unter Kontrolle des nativen Promotors und des *nos*-Terminators, wobei die Region, die für die Aminosäuren 44-57 kodiert, deletiert wurde. Das Plasmid wurde durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma31 und Oma32 mit Plasmid p123-Ppit2-UmPit2 als *Template* und anschließender *Bluntend*-Ligation hergestellt.

p123-Ppit2-UmPit2^{mut49-53} (Mueller *et al.*, 2013)

Das Plasmid wurde durch gezielte Mutagenese (siehe Abschnitt 4.5.2.4) unter Verwendung des Primers Oma90 mit Plasmid p123-Ppit2-UmPit2 als *Template* hergestellt.

p123-Ppit2-UmPit2^{Δ44-57}-mCherry (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, welches zur mikroskopischen Lokalisierung von UmPit2^{Δ44-57} generiert wurde. Das Plasmid wurde durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma31 und Oma32 mit Plasmid p123-Ppit2-UmPit2-mCherry als *Template* und anschließender *Bluntend*-Ligation hergestellt.

p123-Ppit2-UmPit2^{mut49-53}-mCherry (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, welches zur mikroskopischen Lokalisierung von UmPit2^{mut49-53} generiert wurde. Das Plasmid wurde durch gezielte Mutagenese (siehe Abschnitt 4.5.2.4) unter Verwendung des Primers Oma90 mit Plasmid p123-Ppit2-UmPit2-mCherry als *Template* hergestellt.

p123-Ppit2-UmPit2-/UmPit2^{Δ44-57}-/UmPit2^{mut49-53}-mCherry-HA (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, welches zum Nachweis von UmPit2-/UmPit2^{Δ44-57}-/UmPit2^{mut49-53}-mCherry-HA in Western Blot Analysen generiert wurde. Hierfür wurden UmPit2-/UmPit2^{Δ44-57}-/UmPit2^{mut49-53}-mCherry mithilfe der Primer Oma150 und Oma171 mit den Plasmiden p123-Ppit2-UmPit2-/UmPit2^{Δ44-57}-/UmPit2^{mut49-53}-mCherry als *Template* amplifiziert und über *SacI* und *NotI* in p123 kloniert.

p123-Ppit2-UmPID14

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 44-57 von um01375 kodiert unter Kontrolle des nativen Promotors und des *nos*-Terminators. Hierfür wurden die Primer Oma128 und Oma129, welche exakt komplementär zueinander sind, gemischt, denaturiert und anschließend durch Abkühlen hybridisiert. Danach wurden die so hergestellten DNA-Fragmente über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-Ppit2-UmPID14-mCherry

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 44-57 von um01375 kodiert N-terminal zu mCherry fusioniert unter Kontrolle des nativen Promotors und des *nos*-Terminators. Hierfür wurden die Primer Oma130 und Oma131, welche exakt komplementär zueinander sind, gemischt, denaturiert und anschließend durch Abkühlen hybridisiert. Danach wurden die so hergestellten DNA-Fragmente über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry kloniert.

p123-Ppit2-UhPID14

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 43-56 von uh02064 kodiert unter Kontrolle des nativen Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Die Herstellung erfolgte wie die von p123-Ppit2-UmPID14, jedoch unter Verwendung der Primer Oma124 und Oma125.

p123-Ppit2-UhPID14-mCherry

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 43-56 von uh02064 kodiert, N-terminal zu mCherry fusioniert unter Kontrolle des nativen Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Die Herstellung erfolgte wie die von p123-Ppit2-UmPID14-mCherry, jedoch unter Verwendung der Primer Oma126 und Oma127.

p123-Ppit2-SrPID14

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 47-60 von sr10529 kodiert unter Kontrolle des nativen Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Die Herstellung erfolgte wie die von p123-Ppit2-UmPID14, jedoch unter Verwendung der Primer Oma117 und Oma118.

p123-Ppit2-SrPID14-mCherry

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 47-60 von sr10529 kodiert N-terminal zu mCherry fusioniert unter Kontrolle des nativen Promotors von um01375, dessen

Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Die Herstellung erfolgte wie die von p123-Ppit2-UmPID14-mCherry, jedoch unter Verwendung der Primer Oma122 und Oma123.

p123-Ppit2-MpPID14

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 45-58 von mp4_3204_1 kodiert unter Kontrolle des nativen Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Die Herstellung erfolgte wie die von p123-Ppit2-UmPID14, jedoch unter Verwendung der Primer Oma138 und Oma139.

p123-Ppit2-MpPID14-mCherry

Enthält die Sequenz, die für die Aminosäuren 45-58 von mp4_3204_1 kodiert N-terminal zu mCherry fusioniert unter Kontrolle des nativen Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Die Herstellung erfolgte wie die von p123-Ppit2-UmPID14-mCherry, jedoch unter Verwendung der Primer Oma140 und Oma141.

p123-Ppit2-UhPit2

Enthält uh02064 unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern Oma109 und Oma92 amplifiziert und über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-Ppit2-UhPit2-mCherry-HA

Enthält uh02064 N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern Oma109 und Oma110 amplifiziert und über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-Ppit2-SrPit2

Enthält sr10529 unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern Oma111 und Oma96 amplifiziert und über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-Ppit2-SrPit2-mCherry-HA

Enthält sr10529 N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit

den Primern Oma111 und Oma112 amplifiziert und über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-Ppit2-MpPit2

Enthält mp4_3204_1 unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern Oma119 und Oma120 amplifiziert und über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-Ppit2-MpPit2-mCherry-HA

Enthält mp4_3204_1 N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern Oma119 und Oma121 amplifiziert und über *Xma*I und *Xba*I in p123-Ppit2-pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-UhPit2-UmPID14 (Breuer, 2013)

Enthält uh02064, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma189 und Oma190 durch die von um01375 ersetzt wurde, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma109 und Oma92 eingesetzt. Über *Xma*I und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-UhPit2-UmPID14-mCherry-HA (Breuer, 2013)

Enthält uh02064, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma189 und Oma190 durch die von um01375 ersetzt wurde, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma109 und Oma110 eingesetzt. Über *Xma*I und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-SrPit2-UmPID14 (Breuer, 2013)

Enthält sr10529, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma191 und Oma192 durch die von um01375 ersetzt wurde, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma111 und Oma96 eingesetzt. Über *Xma*I und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-SrPit2-UmPID14-mCherry-HA (Breuer, 2013)

Enthält sr10529, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma191 und Oma192 durch die von um01375 ersetzt wurde, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma111 und Oma112 eingesetzt. Über *Xma*I und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-MpPit2-UmPID14 (Breuer, 2013)

Enthält mp4_3204_1, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma193 und Oma194 durch die von um01375 ersetzt wurde, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma119 und Oma120 eingesetzt. Über *Xma*I und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-MpPit2-UmPID14-mCherry-HA (Breuer, 2013)

Enthält mp4_3204_1, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma193 und Oma194 durch die von um01375 ersetzt wurde, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma119 und Oma121 eingesetzt. Über *Xma*I und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-UmPit2-UhPID14

Enthält um01375, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma142 und Oma143 durch die von uh02064 ersetzt wurde, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma150 und Oma151 eingesetzt. Über *Sac*II und *Xba*I wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2 kloniert.

p123-UmPit2-UhPID14-mCherry-HA

Enthält um01375, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma142 und Oma143 durch die von uh02064 ersetzt wurde, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-

Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma201 und Oma36 eingesetzt. Über *SacII* und *XbaI* wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-UmPit2-SrPID14

Enthält um01375, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma144 und Oma145 durch die von sr10529 ersetzt wurde, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma150 und Oma151 eingesetzt. Über *XmaI* und *XbaI* wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-UmPit2-SrPID14-mCherry-HA

Enthält um01375, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma144 und Oma145 durch die von sr10529 ersetzt wurde, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma201 und Oma36 eingesetzt. Über *SacII* und *XbaI* wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-UmPit2-MpPID14

Enthält um01375, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma146 und Oma147 durch die von mp4_3204_1 ersetzt wurde, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma150 und Oma151 eingesetzt. Über *XmaI* und *XbaI* wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP kloniert.

p123-UmPit2-MpPID14-mCherry-HA

Enthält um01375, wobei die PID14-Region mit den Primern Oma146 und Oma147 durch die von sr10529 ersetzt wurde, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *Template* für eine PCR mit den Primern Oma201 und Oma36 eingesetzt. Über *SacII* und *XbaI* wurde das dabei entstandene DNA-Fragment in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-UmPit2PID^{mutUmPID14-Uh1}

Enthält um01375, wobei die Regionen die für die Aminosäuren 46, 52 und 54 kodieren durch die von uh02064 ersetzt wurden. Das Plasmid wurde durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma197 und Oma198 mit Plasmid p123-Ppit2-UmPit2 als *Template* und anschließender *Bluntend*-Ligation hergestellt.

p123-UmPit2PID^{mutUmPID14-Uh1}-mCherry-HA

Enthält um01375, die Regionen die für die Aminosäuren 46, 52 und 54 kodieren durch die von uh02064 ersetzt wurden, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern mit den Primern Oma201 und Oma36 amplifiziert und über *SacII* und *XbaI* in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

p123-UmPit2PID^{mutUmPID14-Uh2}

Enthält um01375, wobei die Regionen die für die Aminosäuren 50 und 53 kodieren durch die von uh02064 ersetzt wurden. Das Plasmid wurde durch invers-PCR unter Verwendung der Primer Oma199 und Oma200 mit Plasmid p123-Ppit2-UmPit2 als *Template* und anschließender *Bluntend*-Ligation hergestellt.

p123-UmPit2PID^{mutUmPID14-Uh2}-mCherry-HA

Enthält um01375, die Regionen die für die Aminosäuren 50 und 53 kodieren durch die von uh02064 ersetzt wurden, N-terminal zu mCherry-HA fusioniert, unter Kontrolle des Promotors von um01375, dessen Signalpeptid und des *nos*-Terminators. Das Gen wurde mit den Primern mit den Primern Oma201 und Oma36 amplifiziert und über *SacII* und *XbaI* in p123-Ppit2-Pit2SP-mCherry-HA kloniert.

4.3.6.3 Plasmide zur Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli***pET22b** (Novagen, Madison/USA)

Ausgangsplasmid für die Expression von CP2 in *E. coli*. Durch die 3'-Ende Fusion an eine Sequenz, welche für einen Hexahistidin-*tag* kodiert, ist es möglich, die hergestellten Proteine über das Ni-NTA-System aufzureinigen. Dieses Plasmid vermittelt Amp-Resistenz.

pRSET-GST-PP (Schreiner *et al.*, 2008)

Dieses Plasmid basiert auf einem von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) unter dem Namen pRSET vertriebenen Plasmid. Dieses wurde dahingegen modifiziert, dass der Hexahistidin-*tag* durch einen GST (Glutathion-S-Transferase)-*tag* ersetzt wurde. Am

3'-Ende des *gst*-Gens befindet sich eine Region, die für eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz kodiert, was es ermöglicht, den GST-tag zu entfernen. Dieses Plasmid diente als Ausgangsplasmid zur Herstellung verschiedener Pit2-Varianten. Dieses Plasmid vermittelt Amp-Resistenz.

pRSET-GST-PP-UmPit2 (Mueller *et al.*, 2013)

Das Plasmid wurde generiert, um UmPit2 in *E. coli* zu produzieren. Es enthält um01375 ohne Signalpeptid. Das Gen wurde mit den Primern ODA31 und OGU85 amplifiziert und über *Xho*I und *Eco*RI in pRSET-GST-PP kloniert.

pRSET-GST-PP-UmPit2^{mut49-53} (Mueller *et al.*, 2013)

Das Plasmid wurde generiert, um UmPit2^{mut49-53} in *E. coli* zu produzieren. Mit Hilfe des Primers Oma90 wurden zu diesem Zweck Punktmutationen in Plasmid pRSET-GST-PP-UmPit2 erzeugt.

pET22b-CP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Das Plasmid wurde generiert, um CP2 in *E. coli* herzustellen. Es enthält NP_001105479, welches mit Hilfe der Primer ODA67 und ODA68 amplifiziert und über *Nde*I und *Hind*III in pET22b kloniert wurde.

4.3.6.4 Plasmide zur transienten Expression von Genen in *N. benthamiana*

pGreenII0029

Ausgangsplasmid für transiente Expression von Genen in *N. benthamiana*. Dieses Plasmid basiert auf pGreen0000 (Hellens *et al.*, 2000) und vermittelt Kan-Resistenz.

pGreen-CP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp2* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001105479, welches durch die Primer OCFH94 und Oma41 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pGreen-CP1A (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp1a* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001148706, welches durch die Primer OCFH90 und Oma45 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pGreen-XCP2 (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp1a* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001149806, welches durch die Primer OCFH92 und Oma54 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

pGreen-CatB (Mueller *et al.*, 2013)

Plasmid, das zur transienten Expression von *cp1a* in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält NP_001150152, welches durch die Primer OCFH92 und Oma54 amplifiziert und über *Xba*I und *Sac*I in pGreenII0029 kloniert wurde.

4.4 Mikrobiologische Standardmethoden

4.4.1 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurde ein nach Cohen *et al.* (1972) modifiziertes Protokoll verwendet, wobei es sich um eine Rubidium-Chlorid-vermittelte Transformation handelt. So wurden zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen 100ml dYT-Medium, das mit 10mM MgSO₄ und 10mM MgCl₂ versetzt wurde, mit 1ml einer frischen *E. coli*-ÜN-Kultur beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von ungefähr 0,5 bei 37°C und 200rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 15min bei 1.500g und 4°C wurde das resultierende Pellet in 33ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30-60min auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15min bei 1.500g und 4°C) und das Pellet wurde erneut, diesmal in 5ml eiskalter RF2-Lösung, resuspendiert und anschließend 15min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension zu je 50µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 1-5µl Plasmidlösung (1-5ng DNA) bzw. 1-5µl Ligationsansatz (siehe Abschnitt 4.5.2.2) vermischt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30sek bei 42°C wurde der Transformationsansatz für 2min auf Eis inkubiert, mit 500µl dYT-Medium versetzt und zur Expression der durch das Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz für 1h bei 37°C und 200rpm horizontal geschüttelt. Anschließend wurden 100µl dieses Ansatzes auf eine selektive dYT-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

4.4.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Die Herstellung und Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte nach einem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (1988), wobei anstelle des dort aufgeführten YEB-Flüssigmediums dYT-Flüssigmedium verwendet wurde.

4.4.3 Transformation von *U. maydis*

Für die Transformation von *U. maydis* wurde ein Protokoll nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992) verwendet, welches wie folgt modifiziert wurde. Es wurden 4ml YEPS_{light}-Medium mit einer auf PD-Medium gewachsenen Kultur inokuliert und für 8-10h bei 28°C und 200rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde danach 1:300 in 50ml frischem YEPS_{light}-Medium verdünnt und bei 28°C und 200rpm bis zu einer maximalen OD_{600nm} von ca. 0,8 geschüttelt. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugation (10min bei 2800g und 4°C) geerntet, einmal mit 25ml eiskaltem SCS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (10min bei 2800g und 4°C) und in 2ml SCS-Puffer mit 2,5-5mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer ablaufende Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt, wobei die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (10-15min) erfolgte die Zugabe von 10ml SCS-Puffer und die Protoplasten wurden für 10min bei 4°C und 1500g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet wurde dreimal mit je 10ml eiskaltem STC-Puffer gewaschen, um Novozym-Reste vollständig zu entfernen. Danach wurde das Pellet in 0,5ml eiskaltem STC-Puffer resuspendiert, die Protoplasten zu je 50µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit bis zu 5µg linearisierter Plasmid-DNA (maximal 10µl) und 1µl Heparin-Lösung für 10min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,5µl STC/PEG-Lösung und ein weiterer Inkubationsschritt für

10min auf Eis. Danach wurde der gesamte Transformationsansatz auf eine frische mit antibiotikahaltigem Top-Agar überschichtete Regenerations-Agarplatte ausgebracht und für 2-5d bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden gewachsene Kolonien auf Antibiotikum-haltigen Platten vereinzelt. Resultierende Einzelkolonien wurden zur DNA-Präparation verwendet (siehe Abschnitt 4.5.1.2) und durch Southern-Blot-Analyse verifiziert (siehe Abschnitt 4.5.3.2).

SCS-Lösung	20mM Na-Citrat, pH 5,8 1M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
STC-Lösung	10mM Tris-Cl, pH 7,5 100mM CaCl ₂ 1M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
STC/PEG-Lösung	40% (w/v) PEG4000 in STC; sterilfiltriert
Regenerations-Agar	Top: 1,5% (w/v) Bacto Agar 1M Sorbitol in YEPS _{light} Bottom: wie Top, zusätzlich zweifach konzentriertes Antibiotikum

4.4.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte wie im *DUALmembrane starter kit manual* beschrieben. Hierzu wurden 5ml YPD-Flüssigmedium mit einer einzelnen Kolonie von AH109 beimpft und über Nacht bei 28°C und 200rpm inkubiert. Ausgehend davon wurde in 50ml YPD-Medium eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt, woraufhin eine Wachstumsphase bis zu einer maximalen OD_{600nm} von 0,8 erfolgte. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei RT für 5min bei 2.500g geerntet und das resultierende Pellet in 2,5ml H₂O_{bid.} resuspendiert. Danach wurden 100µl Zellsuspension zu jeweils 300µl PEG-Li-Acetat-Mix, inklusive 1,5µg der zu transformierenden DNA, gegeben. Daraufhin erfolgte der Hitzeschock für 45min bei 42°C, bevor die Zellen für 10min bei 700g abzentrifugiert und das Pellet in 100µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendiert wurde. Der vollständige Transformationsansatz wurde anschließend auf entsprechendem Selektionmedium ausplattiert und für 3-5d bei 28°C inkubiert.

PEG/LiOAc-MasterMix	240µl 50% (w/v) PEG4000 36µl 1M Li-Acetat 25µl <i>Single-stranded carrier</i> DNA
---------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

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

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAprep Mini Plasmid Prep Kits isoliert, welches nach dem Prinzip der alkalischen Lyse funktioniert. Hierzu wurden 2ml einer *E. coli* üN-Kultur bei 17.000g für 2min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden zur Zell-Lyse 250µl Puffer P2 hinzugegeben und die Proben durch mehrfaches Invertieren gemischt. Danach folgte die Zugabe von 300µl Puffer P3, um den pH-Wert des Gemisches zu neutralisieren und die enthaltenen Proteine zu fällen, welche zusammen mit den Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 17.000g für 10min pelletiert wurden. Der klare Überstand wurde dann in einem neuen Reaktionsgefäß mit 600µl eiskaltem Isopropanol gemischt, was zur Fällung der enthaltenen Plasmid-DNA führt, welche anschließend durch Zentrifugation (10min bei 17.000g) pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde mit 800µl 80% Ethanol gewaschen und erneut für 10min bei 17.000g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet nach kurzem Trocknen in 50µl H₂O_{bid.} resuspendiert.

4.5.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis* wurde ein nach Hoffman und Winston (1987) modifiziertes Protokoll verwendet. Zunächst wurden 2ml einer *U. maydis* üN-Kultur durch Zentrifugation für 2min bei 17.000g sedimentiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Zugabe von 400µl *Ustilago*-Lysepuffer, 500µl Phenol/Chloroform und ca. 0,3g Glasperlen (0,4-0,6mm; Sartorius, Göttingen), bevor die Proben für 20min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) bei 2500rpm geschüttelt und anschließend für 15min bei 17.000g zentrifugiert wurden. Danach wurde die obere Phase abgenommen, die enthaltene DNA in einem neuen Reaktionsgefäß durch Mischen mit 1ml 100% Ethanol gefällt und für 2min bei 17.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet kurz getrocknet, in 50µl TE-Puffer mit 20µg/ml RNase A resuspendiert und für 30min bei 55°C und 1.200rpm im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

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

4.5.2 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

4.5.2.1 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA-Fragmenten wurden Typ-II-Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt/Main) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte je nach anschließendem Verwendungszweck für 2-16h bei enzymespezifischer Temperatur, wobei die eingesetzte DNA-Menge zwischen 0,5 und 5µg lag. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5-5 µg DNA
2µl enzymespezifischer 10x NEB-Puffer
0,2µl 100x BSA (NEB)
0,5U Restriktionsendonuklease
add 20µl H₂O_{bid.}

4.5.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die bei einem Restriktionsverdau entstandenen, aufgereinigten Fragmente konnten anschließend durch Ligation neu verknüpft werden, wobei das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mit Hilfe der Ligase, unter Verbrauch von ATP verbunden werden. Ein Standard-Ligationsansatz mit einem Volumen von 20µl beinhaltete folgende Komponenten:

50ng Vektor-DNA
Insert-DNA in drei- bis zehnfachem molarem Überschuss
2µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer
1µl T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Bonn)
ad 20µl H₂O_{bid.}

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C.

4.5.2.3 Polymerasekettenreaktion

Um DNA-Fragmente für Klonierungs- oder zu analytischen Zwecken zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewandt (Mullis *et al.*, 1986). Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Zur Amplifikation von DNA, die für Klonierungszwecke benutzt wurde, wurde die Phusion® *Hot Start High-Fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific,

Bonn) verwendet. Für analytische Zwecke wurde die im RedMix (Bioline, Luckenwalde) enthaltene Taq-Polymerase benutzt. Nachfolgend sind typische Ansätze für die einzelnen Polymerasen beschrieben, wobei diese, je nach Verwendungszweck, mit einem Volumen von 20 oder 50µl angefertigt wurden. Dabei wird das jeweilig verwendete PCR-Programm nach folgendem Schema dargestellt: Initiale Denaturierung - [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen - finale Elongation. Die Elongationszeit wurde anhand der zu erwartenden Fragmentgröße und nach Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase gewählt. Die verwendete Anlagerungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide, welche zuvor *in silico* mittels des Programmes Clonemanager 9.0 (Sci-Ed Software, Cary/USA) bestimmt wurde. Sämtlich PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (T-Personal, Biometra, Jena) durchgeführt.

Phusion-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn):

20µl Ansatz: ca 20ng Matrizen-DNA
1µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´-Strang)
1µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´-Strang)
1x konzentrierter GC-Puffer
9% (v/v) DMSO
1,2U Phusion-Polymerase
600µM dNTPs (Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1)

Programm:

98°C/30s – [98°C/15s – 55-65°C/15s – 72°C/20s/kb] x 30-35 – 72°C/7min

RedMix (Bioline, Luckenwalde):

20µl Ansatz: ca 20ng Matrizen-DNA
1x konzentrierter RedMix
1µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5´-Strang)
1µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3´-Strang)
9% (v/v) DMSO

Programm:

94°C/2min – [94°C/30s – 55-65°C/20s – 72°C/30s/kb] x 30-35 – 72°C/7min

4.5.2.4 Gezielte Mutagenese von Nukleinsäuren

Der gezielte Austausch einzelner oder mehrerer Basen in Plasmiden wurde mittels PCR mit bis zu drei Oligonukleotiden, die die entsprechenden Mutationen enthielten unter Verwendung des *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene, LaJolla/USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.5.2.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Sämtliche Sequenzierungen erfolgten bei der Firma MWG (Martinsried) nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Entsprechende Plasmide, die zu sequenzierende Fragmente enthielten, wurden zunächst mittels *QiaPrep Plasmid Prep Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert und die Konzentration der enthaltenen DNA photometrisch bestimmt.

4.5.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

4.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur größenspezifischen Auftrennung von Nukleinsäuren wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, wobei die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode wandert. Hierzu wurden, je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente, Gele mit einem Agarosegehalt zwischen 0,8 und 2% verwendet, wobei die Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer gelöst wurde und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,25µg/ml) versetzt wurde. Das Gel wurde in flüssigem Zustand in eine vorbereitete Gelform gegossen, nach dem Erstarren in eine dafür vorgesehene Gelkammer transferiert und mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Anschließend konnten mit Ladepuffer versetzte DNA-Proben auf das Gel aufgetragen werden und bei konstanter Spannung von 80 bis 120V aufgetrennt werden. Die DNA konnte anschließend durch UV-Bestrahlung bei 365nm sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation fand mit einer Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System; UVP) statt.

50x TAE-Puffer	2M Tris-Base 2M Essigsäure 50mM EDTA pH 8,0
6x DNA-Ladepuffer	50% (w/v) Saccharose 0,1% (w/v) Bromphenolblau in TE-Puffer

4.5.3.2 Southern-Analyse

Zunächst wurde nach der in Abschnitt 4.5.1.2 beschriebenen Methode genomische DNA aus zu analysierenden *U. maydis*-Transformanten isoliert und etwa 5µg der gewonnenen DNA mit Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Hierbei wurden die Enzyme so gewählt, dass die Anzahl und/oder die Größe der entstandenen

Fragmente in diesem Locus aufgrund der Integration des transformierten Konstruktes verändert war. Die geschnittene DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Endvolumen 3M Kaliumacetat und 3 Volumen 100% Ethanol gefällt und für 5min bei 17.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet zunächst mit 750µl 80% Ethanol gewaschen und dann erneut für 5min bei 17.000g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet kurz getrocknet, bevor es in 20µl 1x DNA-Ladepuffer resuspendiert wurde. Danach wurde die fragmentierte DNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (1x TAE-Puffer, 0,8% Agarose, 120V) und mit einer nach Southern (1975) modifizierten Methode auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; GE Healthcare, München) transferiert. Vor dem Transfer der DNA wurde eine Depurinierung durchgeführt, wodurch der Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Hierzu wurde das Agarosegel zunächst für 15min in 0,25N HCl schüttelnd inkubiert und anschließend für 15min in 0,4N NaOH neutralisiert. Der Transfer erfolgte schließlich, indem die Transfer-Lösung (0,4N NaOH) über Kapillarkräfte aus einem Pufferreservoir durch das Gel hindurch in einen Stapel Papiertücher gesaugt wurde, wobei die DNA-Fragmente durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert werden und an die darüber liegende Nylonmembran binden. Der Transfer erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 5h, wobei in diesem Fall in regelmäßigen Abständen die Papiertücher ausgetauscht wurden. Die auf der Membran befindliche DNA wurde sofort durch crosslinking (Ultraviolet Crosslinker, Amersham Life Science) fixiert und die Membran zunächst in einer Hybridisierungsröhre mit ca. 20ml Southern-Hybridisierungspuffer für 1-2h bei 65°C im Hybridisierungssofen (UVP HB-1000 Hybridizer, Cambridge, UK) prähybridisiert. Der spezifische Nachweis immobilisierter DNA erfolgte mit Hilfe Digoxigenin(DIG)-markierter DNA-Fragmente, welche mittels PCR und unter Verwendung des PCR DIG *Labeling* Mix Kits (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben amplifiziert wurden. Die auf diese Weise hergestellten DNA-Sonden wurden vor Verwendung für 10min bei 100°C denaturiert und dann mit 40ml auf 65°C vorgewärmtem Southern-Hybridisierungspuffer gemischt. Anschließend wurde der Southern-Hybridisierungspuffer in der Hybridisierungsröhre, durch die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, Hitze-denaturierte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen. Am nächsten Morgen wurde die Membran nach Entfernen der Sonde zweimal für 15min mit Southern-Waschpuffer bei 65°C gewaschen, alle folgenden Schritte erfolgten bei

Raumtemperatur. Dabei wurde die Membran einmal für 5min in DIG-Waschpuffer und anschließend für 30min in DIG-Puffer 2 inkubiert, welche danach durch Antikörperlösung ersetzt wurde, worin die Membran für weitere 30min inkubiert wurde. Dann wurde, um überschüssigen Antikörper von der Membran zu entfernen, zweimal für je 15min mit DIG-Waschpuffer gewaschen, woraufhin die Membran für 5min mit DIG-Puffer 3 inkubiert wurde, um den für die kovalent an den Antikörper gebundene Phosphatase optimalen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Anschließend wurde deren Substrat CDP Star (Roche, Mannheim) 1:100 in DIG-Puffer 3 verdünnt und die Membran für 5min damit inkubiert, bevor sie in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 15min bei 37°C inkubiert wurde, wodurch eine lichtproduzierende Reaktion aktiviert wurde. Danach erfolgte die Exposition eines lichtsensitiven Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) je nach Intensität des Signals für 1-30min und die Entwicklung in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica).

1M Natriumphosphatpuffer	Lösung 1: 1M Na ₂ HPO ₄ Lösung 2: 1M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O Lösung 1 in einem Gefäß vorlegen und solange Lösung 2 zugeben, bis pH 7,0 erreicht ist.
Southern-Hybridisierungspuffer	500mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7% (w/v) SDS
Southern-Waschpuffer	0,1M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1% (w/v) SDS
DIG-Puffer 1	0,1M Maleinsäure, pH 7,5 0,15M NaCl
DIG-Puffer 2	0,1M Maleinsäure, pH 7,5 0,15M NaCl 1% (w/v) Milchpulver
DIG-Puffer 3	0,1M Maleinsäure, pH 9,5 0,1M NaCl 0,05M MgCl ₂
DIG-Waschpuffer	0,1M Maleinsäure, pH 7,5 0,15M NaCl 0,3% (v/v) Tween-20
CDP-Star-Lösung	100µl-CDP-Star (Roche, Mannheim) in 10ml DIG-Puffer 3

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Hierbei ist es möglich, denaturierte Proteine nach ihrer Molekülgröße in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Für ein vollständiges Denaturieren werden die zu analysierenden Proteinproben mit 1x SDS-Gelladepuffer in Anwesenheit von 100mM Dithiothreitol (DTT) für 5min auf 99°C erhitzt, wobei sich die negativ geladenen SDS-Moleküle an die Proteine anlagern und ihnen dadurch eine proportional zur Molekülgröße negative Ladung verleihen. Es wurden vertikale Gele (10,5 x 11,5 x 0,1cm) verwendet (Mini Protean System, BioRad, München), welche sich aus Sammel- und Trenngel zusammensetzten. Durch Einsatz entsprechender Kämme (BioRad, München) im Sammelgel werden Taschen erzeugt, in die die vorbereiteten Proben eingefüllt werden können. Das Sammelgel ist relativ weitporig und dient der Konzentrierung der Probe vor dem Eintritt in das Trenngel, wobei die unterschiedliche Mobilität der Proteine bei verschiedenen pH-Werten genutzt wird. Im Trenngel werden die in der Probe enthaltenen Proteine in einem Polyacrylamidnetz nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern, als größere. Je höher der Anteil an Acrylamid, umso engmaschiger ist das Molekularnetz. Somit werden zur Auftrennung kleiner Proteine höherprozentige Gele verwendet und zur Auftrennung großer Proteine niedrigprozentige Gele. Als Laufpuffer in der Gelkammer wurde SDS-Laufpuffer verwendet. Die Molekülmasse von Proteinen konnte mithilfe eines vorgefärbten Proteinstandardgemisches (*Prestained* Protein Marker 10-170kDa, Fermentas, St. Leon-Roth) abgeschätzt werden. Ein typischer Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 120-160V für ca. 1h.

6x SDS-Gelladepuffer	4M Tris-HCl, pH 6,8 6% (w/v) SDS 0,15% (w/v) Bromphenolblau 60% (v/v) Glycerin
SDS-Laufpuffer	25mM Tris-HCl, pH 8,3 192mM Glycin 4mM SDS

Sammelgel	5% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 125mM Tris-HCl, pH 6,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Trenngel	12-17% (v/v) Acrylamid 0,1% (w/v) SDS in 375mM Tris-HCl, pH 8,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05% (v/v) TEMED

4.6.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western Blot)

Die per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-dry* Transfer System (BioRad, München) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dafür wurde eine Lage 3mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer befeuchtet und mit der Nitrozellulose-Membran bedeckt. Darauf wurde dann blasenfrei das SDS-Gel gelegt, welches zuvor für etwa 5min in Transfer-Puffer äquilibriert wurde und mit einem weiteren feuchten 3mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1h bei 100mA/Gel. Anschließend konnten die auf die Membran transferierten Proteine spezifisch detektiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 6 aufgelistet. Die Membran wurde für 1h bei RT mit Blockierlösung inkubiert, welche dann durch Antikörperlösung, die den primären Antikörper enthielt, ersetzt wurde und für ca. 16h bei 4°C schwenkend inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 10min mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit TBS-T-Puffer, welcher den sekundären Antikörper enthielt, für 1h bei RT inkubiert. Für die Western-Analysen wurden *horse radish peroxidase* (HRP)-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T-Puffer für jeweils 10min wurde die Membran für 5min mit ECL Plus Western Blot *detection reagent* (GE Healthcare, München) inkubiert und dann in einer Folie verschweißt in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Es folgte die Exposition eines Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) für 1-60min, je nach Intensität des Lichtsignals. Entwickelt wurden Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

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

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

Tab. 6: Verwendete Antikörper und HRP-Konjugate.

Antikörper	Verwendung	Bezugsquelle
anti-HA (aus Maus)	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:10.000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-c-Myc	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von c-Myc-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:5.000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Maus-HRP (aus Pferd)	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden (Verdünnung 1:2.500).	Cell Signaling Technology (Danver, USA)
Streptavidin-Peroxidase	Konjugat aus kovalent gebundenem Streptavidin und <i>Horseradish</i> -Peroxidase zur Detektion von Biotin (Verdünnung 1:3.000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

4.6.3 Coomassie-Proteinfärbung

Um Proteine nach SDS-PAGE sichtbar zu machen wurde PageBlue Proteinfärbelösung (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Herstellerangaben verwendet. Die auf dem Coomassie *Brilliant Blue* R250 basierende Colloid-Coomassielösung ermöglicht die Detektion von Proteinen im SDS-Gel bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 5ng. Die Entfärbung der Gele erfolgt durch Waschen in H₂O_{bid.}.

4.6.4 Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen in SDS-Gelen wurde eine Silberfärbung unter Verwendung des PageSilver™ *Silver Staining Kits* (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierdurch könne Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 0,05ng detektiert werden.

4.6.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Quantifizierung von Proteinmengen in Proteinextrakten oder nach Aufreinigung von Proteinen erfolgte mithilfe der Methode von Bradford (1976). Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standard eingesetzt.

4.6.6 Heterologe Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden entweder Tuner(DE3)pLysS-Zellen oder BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet. Informationen bezüglich der transformierten Plasmide, der daraus resultierenden Stämme, sowie die entsprechenden Induktionsbedingungen können Tab. 7 entnommen werden.

Tab. 7: Bedingungen zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine.

Plasmid	Stamm	IPTG [mM]	Inkubationszeit [h]	Inkubations-temperatur [°C]
pRSET-GST-PP-UmPit2	Tuner(DE3)pLysS-GST-Pit2	1	16	16
pRSET-GST-PP-UmPit2 ^{mut49-53}	Tuner(DE3)pLysS-GST-Pit2 ^{mut49-53}	1	16	16
pET22b-Cp2-His	BL21(DE3)pLysS-CP2-His	1	16	16

Von dem jeweiligen *E. coli*-Stamm wurde zunächst eine Vorkultur in dYT-Flüssigmedium, das mit den benötigten Antibiotika supplementiert wurde, angesetzt. Diese wurde über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vorkultur 1:100 in 3000ml dYT-Flüssigmedium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika verdünnt und 200ml-weise auf 15 l-Erlenmeyer-Kolben verteilt. Die Zellen wurden nun bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 bei 37°C und 200rpm inkubiert, bevor die Induktion der genomkodierten T7-RNA-Polymerase durch Zugabe einer entsprechenden Menge IPTG (siehe Tab. 7) initiiert wurde. Da allen verwendeten Zielgenen der T7-Promoter vorgeschaltet ist, wird dadurch die Herstellung der entsprechenden, Proteine gestartet. Nach der in Tab. 7 angegebenen, individuellen Inkubationszeit, wurden die Zellen bei 4°C und 6.000g für 30min durch Zentrifugation geerntet und anschließend bei -20°C gelagert. Ein Pellet entspricht hierbei der Menge von 400ml Kultur.

4.6.7 Aufreinigung von GST-Fusions-Proteinen

Die N-terminale Fusion eines Glutathion-S-Transferase (GST)-tags ermöglicht eine Affinitätsreinigung unter Verwendung von an Sepharose gekoppeltem Glutathion und erhöht gleichzeitig die Löslichkeit des daran fusionierten Proteins. Um Proteine ohne GST-tag zu erhalten, befindet sich zwischen GST und dem Zielprotein eine sogenannte PreScission[®] protease cleavage site. Dabei handelt es sich um eine für die kommerziell erwerbliche PreScission[®] Protease (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) spezifische Erkennungssequenz bestehend aus den Aminosäuren LeuGluValLeuPheGln/GlyPro, wobei zwischen Gln und Gly geschnitten wird. Desweiteren enthält die PreScission[®] Protease selbst auch einen GST-tag, sodass diese auch an Glutathion-Sepharose bindet und sich am Ende lediglich das vom GST-tag abgeschnittene Protein im Durchfluss befindet.

Zur Zelllyse wurden entsprechende bei -20°C gelagerte Zell-Pellets auf Eis aufgetaut, in 20ml GST-Lyse-Puffer resuspendiert und 20min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension fünf Mal für 30s auf Eis sonifiziert. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (30min bei 4°C und 45.000g) entfernt. Parallel wurde eine Gravitationsdurchfluss-Säule mit 1ml Glutathion-Sepharose 4B (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) beladen und diese mit 10ml PBS-Puffer äquilibriert. Der Überstand des zentrifugierten Lysats wurde auf die Säule gegeben und für 1h bei 4°C auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, Steinfurt) inkubiert. Danach wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss, welcher ungebundene Proteine enthielt, verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 10ml PBS-Puffer und ein Waschschrte mit 10ml PreScission[®]-cleavage-Puffer. Anschließend erfolgte die spezifische Entfernung des GST-tags mithilfe der PreScission[®] Protease (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden). Hierfür wurden 160U PreScission[®] Protease in 2ml PreScission[®]-cleavage-Puffer auf die Säule gegeben und diese für 16h bei 4°C stehend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss, der Protein ohne GST-tag enthielt, aufgefangen. Verbleibende Proteine wurden durch zweimaliges Waschen mit je 2ml PreScission[®]-cleavage-Puffer ausgespült. Sämtliche Durchfluss-Fraktionen von vier Säulen wurden vereinigt und mittels Amicon Ultra-4 Säulen (Millipore/Merck, Darmstadt, Germany) mit einer Ausschlussgröße von 3kDa zu einem Endvolumen von ca. 6ml nach Herstellerangaben konzentriert. Die resultierende Proteinlösung wurde anschließend sterilfiltriert, auf eine Gelfiltrations-Säule (HiLoad Superdex 200, GE-

Healthcare, Uppsala, Schweden), die zuvor mit Pit2-Lagerungspuffer äquilibriert wurde, geladen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und jene, die reines Protein enthielten wurden vereinigt und erneut mithilfe von Amicon Ultra-4 Säulen (Millipore/Merck, Darmstadt, Germany) mit einer Ausschlussgröße von 3kDa bis zu einem Volumen von etwa 500µl konzentriert. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde anschließend mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Zur Kurzzeitlagerung wurden entsprechende Proteinlösungen bei 4°C gelagert, zur Langzeitlagerung wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) zugegeben und bei -80°C gelagert.

GST-Lyse-Puffer	140mM NaCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄ 2,7mM KCl 0,5mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 pH 7,4
PBS-Puffer	140mM NaCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄ 2,7mM KCl pH 7,3
PreScission [®] - <i>cleavage</i> -Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 1mM EDTA 1mM DTT
Pit2-Lagerungspuffer	50mM Tris-HCl, pH7 150mM NaCl

4.6.8 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen

Zur Affinitätsreinigung von mit Hexahistidin (His6)-*tag* versehenen Proteinen wurde eine IMAC durchgeführt. Diese basiert auf der Chelatierung von an Nitrilotriessigsäure (NTA)-Säulenmaterial immobilisierter Ni²⁺-Ionen, durch die Imidazolgruppen des His6-*tags*. Im Falle der hier beschriebenen Aufreinigung handelte es sich um eine denaturierende Aufreinigung von CP2, da es für dieses Protein nicht möglich war, es in löslicher Form in *E. coli* herzustellen. Daher wurde die unlösliche Pellet-Fraktion denaturiert, eine IMAC unter denaturierenden

Bedingungen durchgeführt und das Protein schließlich wie in Abschnitt 4.6.9 beschrieben wieder rekonstituiert.

Dafür wurde ein bei -20°C gelagertes Zell-Pellet auf Eis aufgetaut, in 10ml Ni-NTA-Lysepuffer resuspendiert und 20min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension fünf Mal für 30s auf Eis sonifiziert und schließlich 30min bei 4°C und $45.000g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet einmal mit 10ml Pellet-Waschpuffer 1, einmal mit 10ml Pellet-Waschpuffer 2 und einmal mit 10ml sterilem Wasser gewaschen, jeweils gefolgt von einem Zentrifugationsschritt für 10min bei 4°C und $45.000g$. Anschließend wurde das Pellet in denaturierendem Ni-NTA-Bindepuffer resuspendiert und für 1-3h bei 4°C auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, Steinfurt) inkubiert, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und $45.000g$ für 20min um unlösliche Bestandteile zu eliminieren. Parallel wurde eine Gravitationsdurchflusssäule mit einem Bettvolumen von 1ml der Ni-NTA-Matrix (Ni-SepharoseTM 6 Fast-Flow, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) beladen und mit 20ml denaturierendem Bindepuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand des denaturierten Pellets auf die Säule gegeben und für 1h bei 4°C auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, Steinfurt) inkubiert. Danach wurde die Säule geöffnet, der Durchfluss, der ungebundene Proteine enthielt verworfen, das Säulenmaterial zunächst dreimal mit je 10ml denaturierendem Ni-NTA-Bindepuffer und schließlich dreimal mit je 10ml denaturierendem Ni-NTA-Waschpuffer gewaschen, bevor die Elution der gebundenen Proteine durch zweimalige Zugabe von je 5ml denaturierendem Ni-NTA-Elutionspuffer erfolgte. Um eine vollständige Denaturierung der enthaltenen Proteine durch Reduktion der Disulfidbrücken zu erreichen, wurde DTT bis zu einer Endkonzentration von 10mM hinzugegeben und die Lösung für 30min auf Eis inkubiert.

Ni-NTA-Lysepuffer	50mM Tris-HCl, pH 8,0 150mM NaCl 5mM EDTA
Pellet-Waschpuffer 1	50mM Tris-HCl, pH 8,0 5mM EDTA 0,1% Triton X-100
Pellet-Waschpuffer 2	50mM Tris-HCl, pH 8,0 5mM EDTA 2M Harnstoff

Ni-NTA-Bindepuffer (denaturierend)	20mM Tris-HCl, pH 7,9 500mM NaCl 20mM Imidazol 6M Guanidin-HCl
Ni-NTA-Waschpuffer (denaturierend)	20mM Tris-HCl, pH 7,9 500mM NaCl 60mM Imidazol 6M Guanidin-HCl
Ni-NTA-Elutionspuffer (denaturierend)	20mM Tris-HCl, pH 7,9 500mM NaCl 1M Imidazol 6M Guanidin-HCl

4.6.9 Rekonstitution und Aktivierung von CP2

Zur Rekonstitution von unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigten Proteinen wurde zunächst die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt und die Konzentration mit denaturierendem Elutionpuffer auf 100µg/ml eingestellt. Die entsprechende Proteinlösung wurde anschließend in eine Dialyse-Kassette (Thermo Scientific, Bonn) mit einem Ausschlussvolumen von 10kDa überführt, über Nacht in einem 5l-Becherglas unter leichtem Rühren (200rpm) auf einem Magnetrührer bei 4°C gegen ein 100faches Volumen Rekonstitutionspuffer dialysiert und schließlich mithilfe von Amicon Ultra-4 Säulen Millipore/Merck, Darmstadt, Germany) mit einer Ausschlussgröße von 10kDa bis zu einem Volumen von etwa 5ml konzentriert. Es folgte ein weiterer Dialyse-Schritt gegen ein 100faches Volumen von CP2-Lagerungspuffer in einem 1l-Becherglas, wiederum bei 4°C und unter leichtem Rühren, wobei nach 1h der Puffer komplett durch frischen Puffer ersetzt wurde. Nach einer weiteren Stunde wurde die Proteinlösung entnommen und erneut mithilfe von Amicon Ultra-4 Säulen (Millipore/Merck, Darmstadt, Germany) mit einer Ausschlussgröße von 10kDa bis zu einem Volumen von etwa 500µl konzentriert. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde anschließend erneut mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Zur Kurzzeitlagerung wurden entsprechende Proteinlösungen bei 4°C gelagert, zur Langzeitlagerung wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) zugegeben und bei -80°C gelagert. Zur Aktivierung von CP2 wurde zunächst der pH-Wert einer entsprechenden Proteinlösung mit Na-Acetat auf 4,5 eingestellt und anschließend Pepsin in einem molaren Pepsin/CP2 Verhältnis von 1:100 hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 1h bei RT, wobei es zur Abspaltung der selbstinhibitorischen Prodomäne kommt, wurde der pH-Wert mit Na-Phosphat auf 6,0 eingestellt, um den

Aktivierungsprozess zu stoppen. Anschließend konnte die Cysteinprotease-Aktivität wie in Abschnitt 4.6.13 beschrieben, gemessen werden.

Rückfaltungspuffer	50mM Tris-HCl, pH 7,0 30% Glycerin 2,5mM Glutathion (reduziert) 1mM Glutathion (oxidiert) 5mM EDTA 150mM NaCl
CP2-Lagerungspuffer	50mM Tris-HCl, pH 7,0 150mM NaCl

4.6.10 Gewinnung von denaturierten Proteinen aus *S. cerevisiae*

In der Regel wurde *S. cerevisiae* als ün-Kultur in Flüssigmedium angezogen und die in 2ml Kultur enthaltenen Zellen durch Zentrifugation geerntet (5min bei 17.000g). Es folgte die Zugabe von ca. 0,3g Glasperlen und 50µl SDS-Gelladepuffer mit 100mM DTT. Anschließend wurden die Proben zunächst für 5min bei 99°C erhitzt und danach für 15min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt, bevor die Proben erneut für 5min bei 99°C inkubiert wurden. Dann wurden die Proben für 2min bei 17.000g zentrifugiert und schließlich 15µl des jeweiligen Überstandes für SDS-PAGE eingesetzt.

4.6.11 Co-Immunopräzipitation

Um Interaktionen von Proteinen aus Hefe nachzuweisen wurde neben der Hefe-zwei-Hybrid Technik auch eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden entsprechende Hefe-Stämme als ün-Kultur in 100ml Flüssigmedium angezogen. Um bestehende Protein-Protein-Interaktionen zu fixieren wurde Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1% (v/v) hinzugegeben und das Ganze für 20min bei RT inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 500mM Glycin, um das *cross-linking* zu stoppen. Die Zellen wurden schließlich abzentrifugiert (5min bei 2.400g und 4°C), das resultierende Pellet in 1,5ml sterilem Wasser gewaschen, erneut abzentrifugiert (5min bei 17.000g und 4°C) und in 1ml IP-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von etwa 0,3g Glasperlen bevor die Zellen schließlich durch starkes Schütteln (1.200rpm) auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) bei 4°C aufgebrochen wurden. Anschließend wurde die Suspension für 10min bei 17.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung des Proteingehalts durch Bradford-Analyse (Bradford, 1976), wurde dieser auf 300µg/ml eingestellt gefolgt von der Zugabe von 40µl Anti-HA *Affinity*

Matrix (Roche, Mannheim) und einer Inkubation bei 4°C über Nacht auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, Steinfurt). Am nächsten Morgen wurde die HA *Affinity Matrix* durch Zentrifugation (1min bei 17.000g) sedimentiert, zweimal mit je 1ml IP-Puffer gewaschen und schließlich in 50µl 2xSDS-Gelladepuffer resuspendiert, bevor die Proben erneut für 5min bei 99°C inkubiert wurden. Dann wurden die Proben für 2min bei 17.000g zentrifugiert und schließlich 25µl Western Blot Analysen eingesetzt, wobei die Detektion unter Verwendung von anti-c-Myc-Antikörpern erfolgte.

IP-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,5
	150mM NaCl
	10mM EDTA
	0,05% (v/v) Tween20
	10µM Phenylmethylsulfonylfluorid

4.6.12 Immunopräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe

Um die Stabilität verschiedener HA-fusionierter Proteine aus *U. maydis* nachzuweisen wurden zunächst Maispflanzen der Sorte Gaspe Flint mit entsprechenden Mutanten infiziert (siehe Abschnitt 4.7.3). 4 Tage nach Infektion wurden infizierte Blattbereiche geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zu einem feinen Pulver gemörsert. Mörser und Pistill wurden zu diesem Zweck in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. 1ml gefrorenes Pflanzenpulver, wurde danach in 15ml Falcon-Röhrchen gefüllt und mit TBS-Puffer mit Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim; 1 Tablette pro 20ml TBS-Puffer) auf etwa 10ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Extrakt durch einen Faltenfilter filtriert und der Durchfluss für 10min bei 4°C und 10.000g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand in ein neues 15ml Falcon-Röhrchen überführt und es wurden 20µl Anti-HA *Affinity Matrix* (Roche, Mannheim) hinzugegeben, mit der das Pflanzenextrakt über Nacht bei 4°C auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, Steinfurt) inkubiert wurde. Danach wurde die *Affinity Matrix* über Handee™ *Spin Columns* (Pierce/Thermo Scientific, Bonn) aufgefangen, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Nach fünfmaligem Waschen mit je 1ml TBS-Puffer wurden an die anti-HA Matrix gebundene Proteine durch Zugabe von 20µl SDS-Gelladepuffer mit 100mM DTT und 5-minütiges Kochen bei 99°C eluiert. Anschließend konnten die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und die HA-fusionierten Proteine per Western Blot detektiert werden.

4.6.13 Protease-Aktivitätstests

Um die Aktivität von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen nachzuweisen wurden fluorimetrische Messungen unter Verwendung des fluoreszierenden Substrates Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-AMC, Sigma-Aldrich, Steinheim) durchgeführt. Dieses Substrat kann von Cysteinproteasen gespalten werden, wobei es zur Freisetzung einer fluoreszierende Gruppe kommt, deren Fluoreszenz bei 460nm detektiert werden kann (Zimmerman *et al.*, 1976). Zur Bestimmung der Cysteinprotease-Aktivität wurden entweder definierte Mengen CP2 oder fraktionierte apoplastische Flüssigkeit verwendet. Hierzu wurden 10µl der zu untersuchenden Probe für 10min mit 80µl Protease-Assaypuffer inkubiert, welcher wahlweise auch E-64 (Sigma-Aldrich, Steinheim), aufgereinigtes Pit2/Pit2^{mut49-53} oder PID14-Peptid-Derivate enthalten konnte. Anschließend wurde durch Zugabe von 10µl einer 100µM Z-Phe-Arg-AMC-Stammlösung die Fluoreszenzreakion gestartet, welche dann in einem Fluorimeter (Tecan Safire, Crailsheim) über einen Zeitraum von 10min gemessen wurde.

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

4.6.14 Aktivitäts-basierte Markierung von Cysteinproteasen

Um die Aktivität von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen in fraktionierter apoplastischer Flüssigkeit zu untersuchen, wurde die Sonde DCG-04 (Greenbaum *et al.*, 2000) verwendet. Es handelt sich dabei um ein biotinyliertes Derivat des spezifischen Cysteinprotease-Inhibitors E-64, der kovalent am Cysteinrest des aktiven Zentrums von Cysteinproteasen bindet. Der Biotinrest ermöglicht schließlich die Detektion von Cysteinproteasen mittels Western Blot.

Zur Aktivitäts-basierten Markierung von Cysteinproteasen wurden je 5µl der zu untersuchenden Fraktion mit 5µM E-64, 10µM gereinigtem Pit2 oder Pit2-Lagerungspuffer für 30min bei RT inkubiert. Danach wurden 2mM DCG-04 hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei RT für 4h auf einem Drehschüttler (Kisker-Biotech, Steinfurt). Die beinhaltenen Proteine wurden schließlich durch Zugabe von 1ml 100% Aceton und Inkubation bei -20°C für mindestens 1h gefällt. Nach Zentrifugation für 5min bei 17.000g wurde das Pellet einmal mit 1ml 80% Aceton gewaschen, erneut für 5min bei 17.000g zentrifugiert und schließlich in 100µl

2x SDS-Gelladepuffer mit 100mM DTT resuspendiert und für 5min auf 99°C erhitzt. Je 25µl dieser Proben wurden in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blockierung der Membran erfolgte in diesem Fall durch TBS-T mit 3% (w/v) BSA für 10min bei RT, bevor die Membran für 1h mit dem Streptavidin-Peroxidase Konjugat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) inkubiert wurde. Die Signaldetektion erfolgte wie in Abschnitt 4.6.2 beschrieben.

4.7 Pflanzenmethoden

4.7.1 Maisvarietäten (*Zea mays* sp.)

Für Infektionsversuche zum Zwecke der Quantifizierung von *U. maydis* Infektionen (Abschnitt 4.7.4) oder zur Mikroskopie (Abschnitt 4.8) wurde die Maisvarietät *Early Golden Bantam* verwendet (Olds Seeds, Madison/USA). Um Immunopräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe (Abschnitt 4.6.12) durchzuführen, wurde die Maisvarietät Gaspe Flint verwendet.

4.7.2 Kultivierung von *Z. mays*

Sämtliche Maispflanzen wurden in einem Gewächshaus kultiviert, wobei die Nachtphase mit 20°C und 60% Luftfeuchte 9h dauerte, die Tagphase mit 28°C und 40% Luftfeuchte 15h. Eingeschlossen in die Tagphase waren 2,5h für die Simulation des Sonnenaufgangs und 3,5h für die Simulation des Sonnenuntergangs (*ramping*). Während der Tagphase betrug die Beleuchtungsintensität mindestens 28.000Lux und bei zusätzlicher Sonneneinstrahlung bis zu 90.000Lux. Pro Topf wurden je vier Maiskörner in Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ oder „T“ ausgesät und einmal täglich gewässert.

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

U. maydis-Stämme, die zur Infektion von *Z. mays* verwendet wurden, wurden über Nacht in YEPS_{light}-Flüssigmedium bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-1 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3min bei 2.400g) geerntet und in sterilem Wasser resuspendiert, so dass eine OD_{600nm} von 1 erreicht wurde. Wurde zum Zwecke der Mikroskopie oder um Immunopräzipitation von HA-fusionierten Proteinen aus infiziertem Maisgewebe (Abschnitt 4.6.12) durchzuführen, infiziert, so wurde eine OD_{600nm} von 3 in sterilem Wasser mit 0,1% (v/v) Tween-20 eingestellt. Standardmäßig wurden "Spritzinfektionen" durchgeführt, wobei 300-500µl der Zellsuspension in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen

injiziert wurden. Dabei wurde die Injektionsstelle etwa 1cm über der Erde gewählt, was etwa 2,5 bis 3cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems ist. Hierbei wurden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen.

4.7.4 Quantifizierung von *U. maydis* Infektionen

Zur Quantifizierung von Pathogenitätssymptomen wurde 12d nach Infektion eine Klassifizierung der Symptome je nach Stärke in sieben verschiedene Kategorien vorgenommen, diese sind in Tab. 8 dargestellt. Standardmäßig wurden je Stamm drei unabhängige Infektionen mit je ca. 40 Pflanzen durchgeführt. Dargestellt wurden schließlich die prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen gemittelten Werte (Kämper *et al.*, 2006).

Tab. 8: Klassifizierung der Symptome infizierter Maispflanzen.

Pflanzensymptom	Beschreibung
Keine Symptome	Die Pflanze zeigt keinerlei Anzeichen einer Infektion
Chlorose	Die Pflanze zeigt chlorotische Verfärbungen an den infizierten Blättern (3. Blatt und jünger)
Kleine Tumore	Die größten Tumore der Pflanze sind < 1mm
Normale Tumore	Die Tumore der Pflanze sind > 1mm
Starke Tumorbildung/Verkümmerung	Sehr starke Tumorbildung, die mit einer Verkrümmung der Sprossachse einhergeht
Tote Pflanze	Die Pflanze ist aufgrund der Infektion mit <i>U. maydis</i> gestorben

4.7.5 Salicylsäure-Infiltration von Maisblättern

Um eine Induktion Abwehr-induzierter apoplastischer Cysteinproteasen zu erreichen, wurde das dritte Blatt von sieben Tage alten Maispflanzen mit 2mM Salicylsäure (SA) in 1% (v/v) Ethanol infiltriert. Hierzu wurde die Lösung von der Blattunterseite mithilfe einer 1ml-Spritze ohne Nadel unter leichtem Druck ins Blatt gedrückt.

4.7.6 Isolation und Fraktionierung von apoplastischer Maisflüssigkeit

Zur Präparation apoplastischer Flüssigkeit aus Maispflanzen wurden entweder SA-infiltrierte Blätter, unbehandelte Blätter oder mit *U. maydis* infizierte Blattbereiche verwendet, wobei in jedem Fall das dritte Blatt horizontal abgeschnitten wurde.

Anschließend wurde das Blattmaterial in einem Exsikkator fünf Mal für je 15min bei 250mbar in H₂O_{bid.} evakuiert. Die so behandelten Blattabschnitte wurden dann gestapelt und vertikal in eine 20ml-Spritze ohne Kolben gesteckt, welche mit der Öffnung nach unten in ein 50ml Falcon gestellt wurde. Die apoplastische Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation für 30min bei 2500g und 4°C gewonnen und konnte anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden. Zur Fraktionierung mittels Anionenaustausch-Chromatographie wurde der Proteingehalt der apoplastischen Flüssigkeit durch Bradford-Analyse (Bradford, 1976) bestimmt. Die Menge, die einem totalen Proteingehalt von 5mg entsprach wurde mit einem Spritzen-Vorsatzfilter sterilfiltriert, mit H₂O_{bid.} auf ein Volumen von 10ml aufgefüllt und schließlich auf eine zuvor mit 20mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0) äquilibrierte MonoQ-Resin-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben. Es folgte die Elution der an die Säule gebundenen Proteine durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1M NaCl in 20mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,0). Hierbei wurden Fraktionen zu je 500µl in einem Gesamtvolumen von 20ml gesammelt, welche anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert wurden.

4.7.7 Kultivierung von *N. benthamiana*

Samen von *N. benthamiana* wurden gleichmäßig auf Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ ausgesät. 4-7d später konnten einzelne Keimlinge in neue Töpfe pikiert werden, die wiederum nach weiteren 10-15d für Infiltrationsexperimente genutzt werden konnten.

4.7.8 Infiltration von *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* und die anschließende Infiltration von *N. benthamiana* erfolgte nach einem Protokoll von (Sparkes *et al.*, 2006). Infizierte Blätter wurden 3d nach Infiltration geerntet.

4.7.9 Isolation von apoplastischer Flüssigkeit aus *N. benthamiana*

Mit *A. tumefaciens* infiltrierte Blätter wurden 3d nach Infiltration geerntet und längsweits mit einem Skalpell geteilt und von ihrem Petiolus befreit. Die halbierten Blätter wurden anschließend in einem Exsikkator drei bis sechs Mal bei 200mBar unter H₂O_{bid.} evakuiert. Die restliche Vorgehensweise erfolgte, wie bereits in Abschnitt 4.7.6 für die Isolation von apoplastischer Maisflüssigkeit beschrieben.

4.8 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Zellmorphologische Betrachtungen von *U. maydis* erfolgten an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie wurde ein TCS-SP5 (Leica, Bensheim) verwendet. Die Anregungs-, sowie Emissionswellenlängen und der entsprechende dafür verwendete Laser für die verschiedenen Anwendungen sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Verwendete Laser und detektierte Emissionswellenlängen bei konfokaler Mikroskopie.

Laser	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Detektion
DPSS Laser	561	580-660nm	mCherry
405 Diode	405	415-460nm	Autofluoreszenz

Die Bildbearbeitung erfolgte mit der zugehörigen LEICA Software (LAS AF; *Leica application suite*). Zweidimensional abgerasterte Ebenen wurden in einer Maximumprojektion übereinander gelegt.

4.9 Bioinformatische Methoden

Zur Planung von Klonierungsstrategien und um Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenzvergleiche durchzuführen, wurde das Programm Clone Manager 9.0 der Firma Sci-Ed-Software verwendet. Die hierfür notwendigen Sequenzen wurden dem *National Center of Biotechnology Information* (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/) und MIPS *U. maydis Database* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) entnommen. Die von diesen Webseiten zur Verfügung gestellten BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; Altschul *et al.*, 1990; 1997)-Funktionen wurden zur Identifizierung von ähnlichen Protein- und Nukleotidsequenzen verwendet. Domänenanalysen wurden mit dem Programm SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) durchgeführt (<http://smart.embl-heidelberg>) und Proteine wurden mittels der Programme SignalP 4.0 (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004); www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) und TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) auf eine N-terminale Signalsequenz bzw. anderweitige Lokalisierungssequenzen hin analysiert. Analyse und Vergleich von Proteasen erfolgte mit der MEROPS (*the peptidase database*)-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2011; <http://merops.sanger.ac.uk/>).

5 Literaturverzeichnis

- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W. und Kahmann, R.** (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol Genet Genomics* **270**: 303-314.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* **6**: 973-979.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (2002). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. *Wiley*.
- Axtell, M.J. und Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369-377.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Exp Mycol* **18**: 247-266.
- Beers, E.P., Jones, A.M. und Dickerman, A.W.** (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**: 43-58.
- Begerow, D., Bauer, R., und Boekhout, T.** (2000). Phylogenetic placements of ustilaginomycetous anamorphs as deduced from nuclear LSU rDNA sequences. *Mycol Res* **104**: 53-60.
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M.-N., Abad, P., Shih, P. und Briggs, S.P.** (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathog* **4**: e1000192.
- Bendtsen, D.J., Nielsen, H., von Heijne, G. und Brunak, S.** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795.
- Birch, P.R.J., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S. und Beynon, J.L.** (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* **14**: 8-11.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 189-214.

- Boller, T. und Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379-406.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M.E., Huitema, E., van der Hoorn, R.A.L. und Kamoun, S.** (2011). *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 20832-20837.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**: 216-226.
- 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**: 1047-1063.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. und Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 423-445.
- Breuer, M.** (2013). Untersuchungen zur Interaktion des Brandpilz Effektorproteins Pit2 mit Cysteinproteasen aus Mais. *Bachelorarbeit*. Philipps-Universität Marburg.
- Broomfield, P.L.E. und Hargreaves, J.A.** (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **22**: 117-121.
- Bulgarelli, D. et al.** (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**: 91-95.
- van den Burg, H.A., Spronk, C.A.E.M., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P.C., Vuister, G.W., de Wit, P.J.G.M. und Vervoort, J.** (2004). Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions. *J Biol Chem* **279**: 16786-16796.
- Büttner, D. und Bonas, U.** (2010). Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 107-133.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G. und Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500.
- 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.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am. Phytopathol. Soc. Monogr.* **2**, 1-41.

- 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. *Proc Natl Acad Sci* **69**: 2110-2114.
- Collier, S.M. und Moffett, P.** (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci* **14**: 521-529.
- Conrath, U. et al.** (2006). Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1062-1071.
- D’Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. und Bellincampi, D.** (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* **1696**: 237-244.
- Dangl, J.L. und Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Dixon, M.S., Golstein, C., Thomas, C.M., van der Biezen, E.A. und Jones, J.D.G.** (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 8807-8814.
- Djamei, A. et al.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395-398.
- Djamei, A. und Kahmann, R.** (2012). *Ustilago maydis*: Dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog* **8**: e1002955.
- Dodds, P.N. und Rathjen, J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539-548.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* **8**: 302-307.
- Doehlemann, G. und Hemetsberger, C.** (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol* **198**: 1001-1016.
- 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.
- 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., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. und Kämper, J.** (2008a). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**: 181-195.

- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R.P., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2008b). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**: 29-40.
- Eickhorst, T. und Tippkötter, R.** (2008). Improved detection of soil microorganisms using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biol Biochem* **40**: 1883-1891.
- van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J.G.M. und Thomma, B.P.H.J.** (2007). The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1092-1101.
- van Esse, H.P., van't Klooster, J.W., Bolton, M.D., Yadeta, K.A., van Baarlen, P., Boeren, S., Vervoort, J., de Wit, P.J.G.M. und Thomma, B.P.H.J.** (2008). The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell Online* **20**: 1948-1963.
- van Esse, H.P., Thomma, B.P.H.J., van 't Klooster, J.W. und de Wit, P.J.G.M.** (2006). Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast. *J Exp Bot* **57**: 599-608.
- Flor, H.H.** (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657.
- Gilroy, E.M. et al.** (2007). Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *Plant J* **52**: 1-13.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. und Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 277-284.
- Govrin, E.M. und Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**: 751-757.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 4645-4649.
- Greenbaum, D., Medzihradzky, K.F., Burlingame, A. und Bogoy, M.** (2000). Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol* **7**: 569-581.
- Haas, B.J. et al.** (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393-398.
- Hanada, K.** (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* **42**: 523-528.

- Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S. und Rathjen, J.P.** (2010). Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 388-393.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. und Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**: 819-832.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. und Doehlemann, G.** (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog* **8**: e1002684.
- Herrberger, C.** (2012). Funktionelle Charakterisierung von Pep1, einem sekretierten Effektorprotein von *Ustilago maydis*. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg.
- Hoffman, C.S. und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* **16**.
- 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 Online* **20**: 2009-2017.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 101-127.
- 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.G. und Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J. und Thomma, B.P.H.J.** (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953-955.
- de Jonge, R. und Thomma, B.P.H.J.** (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* **17**: 151-157.
- 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. et al.** (2006). 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**: 73-83.
- Kauss, H., Fauth, M., Merten, A. und Jeblick, W.** (1999). Cucumber hypocotyls respond to cutin monomers via both an inducible and a constitutive H₂O₂-generating system. *Plant Physiol* **120**: 1175-1182.
- Kimmel, J.R. und Smith, E.L.** (1954). Crystalline Papain I. Preparation, specificity, and activation. *J Biol Chem* **207**: 515-531.
- van't Klooster, J.W., van der Kamp, M.W., Vervoort, J., Beekwilder, J., Boeren, S., Joosten, M.H. a. J., Thomma, B.P.H.J. und de Wit, P.J.G.M.** (2011). Affinity of Avr2 for tomato cysteine protease Rcr3 correlates with the Avr2-triggered Cf-2-mediated hypersensitive response. *Mol Plant Pathol* **12**: 21-30.
- Kniskern, J.M., Traw, M.B. und Bergelson, J.** (2007). Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 1512-1522.
- 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.
- Koharudin, L.M.I., Viscomi, A.R., Montanini, B., Kershaw, M.J., Talbot, N.J., Ottonello, S. und Gronenborn, A.M.** (2011). Structure-function analysis of a CVNH-LysM lectin expressed during plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Structure* **19**: 662-674.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-396.
- Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M. und Kohno, K.** (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J Cell Mol Biol* **37**: 370-378.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. und Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* **278**: 2256-2264.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Güldener, 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 transposable elements. *Plant Cell Online* **24**: 1733-1745.

- Lev, B., Ward, H., Keusch, G.T. und Pereira, M.E.** (1986). Lectin activation in *Giardia lamblia* by host protease: a novel host-parasite interaction. *Science* **232**: 71-73.
- Lévesque, C.A. et al.** (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol* **11**: R73.
- van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R.A.L., Kumlehn, J. und Doehlemann, G.** (2012a). A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases. *Plant Cell Online* **24**: 1285-1300.
- van der Linde, K., Mueller, A.N., Hemetsberger, C., Kashani, F., van der Hoorn, R.A.L. und Doehlemann, G.** (2012b). The maize cystatin CC9 interacts with apoplastic cysteine proteases. *Plant Signal Behav* **7**: 1397-1401.
- 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**: 135-162.
- Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tör, M. und Billiar, T.** (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**: 60-81.
- Lozano-Torres, J.L. et al.** (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 10119-10124.
- Ludwig, A.A., Saitoh, H., Felix, G., Freymark, G., Miersch, O., Wasternack, C., Boller, T., Jones, J.D.G. und Romeis, T.** (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 10736-10741.
- Lundberg, D.S. et al.** (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**: 86-90.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., 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 III, 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.
- Mark, G.L., Dow, J.M., Kiely, P.D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., Morrissey, J. und O'Gara, F.** (2005). Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 17454-17459.
- 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**: 1-20.

- Matsumoto, K., Yamamoto, D., Ohishi, H., Tomoo, K., Ishida, T., Inoue, M., Sadatome, T., Kitamura, K. und Mizuno, H.** (1989). Mode of binding of E-64-c, a potent thiol protease inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *FEBS Lett* **245**: 177-180.
- McInroy, J.A. und Kloepper, J.W.** (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* **173**: 337-342.
- McLellan, H., Gilroy, E.M., Yun, B.-W., Birch, P.R.J. und Loake, G.J.** (2009). Functional redundancy in the *Arabidopsis* Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. *New Phytol* **183**: 408-418.
- Mendgen, K. und Hahn, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* **7**: 352-356.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vraneš, M., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**: 895-911.
- Misas-Villamil, J.C. und van der Hoorn, R.A.** (2008). Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 380-388.
- Morell, M., Espargaró, A., Avilés, F.X. und Ventura, S.** (2007). Detection of transient protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: the Abl-SH3 case. *Proteomics* **7**: 1023-1036.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D. und Doehlemann, G.** (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* **9**: e1003177.
- 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 Genet Biol* **45**, Supplement 1: S63-S70.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Neidig, N.** (2013). Funktionelle Analyse des *Ustilago maydis* Effektorproteins Tin3 im Gencluster 19A. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und Heijne, G. von** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B.F. und Dangl, J.L.** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet* **37**: 579-609.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H. und Boller, T.** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *Sci Signal* **275**: 7521.

- 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.
- Nürnberg, T. und Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**: 372-379.
- 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**: 699-718.
- Oldroyd, G.E.D.** (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**: 252-263.
- Osborn, A.** (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Pechan, T., Cohen, A., Williams, W.P. und Luthe, D.S.** (2002). Insect feeding mobilizes a unique plant defense protease that disrupts the peritrophic matrix of caterpillars. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 13319-13323.
- Peck, S.C., Nühse, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F. und Boller, T.** (2001). Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell Online* **13**: 1467-1475.
- Peiffer, J.A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S.G., Dangl, J.L., Buckler, E.S. und Ley, R.E.** (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 6548-6553.
- Podgorski, I. und Sloane, B.F.** (2003). Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp*: 263-276.
- Prischi, M., Hackl, E., Pastar, M., Pfeiffer, S. und Sessitsch, A.** (2012). Genetically modified Bt maize lines containing cry3Bb1, cry1A105 or cry1Ab2 do not affect the structure and functioning of root-associated endophyte communities. *Appl Soil Ecol* **54**: 39-48.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. und Bateman, A.** (2011). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **40**: D343-D350.
- Rooney, H.C.E., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A.L., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G. und de Wit, P.J.G.M.** (2005). *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**: 1783-1786.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harb Lab Press*.
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B.P. und Mesters, J.R.** (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife* **2**.

- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463-5467.
- Sato, Y., Kameya, M., Arai, H., Ishii, M. und Igarashi, Y.** (2011). Detecting weak protein-protein interactions by modified far-western blotting. *J Biosci Bioeng.***112**: 304-307.
- Schaller, A.** (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**: 183-197.
- Schipper, K.** (2009). Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters, das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert. *Dissertation*. Philipps-Universität Marburg.
- Schirawski, J. et al.** (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**: 1546-1548.
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L. und Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell Online* **17**: 3532-3543.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K.J. und Groll, M.** (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* **453**: 548-552.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, 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. und Panstruga, R.** (2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 641-667.
- Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C. und Métraux, J.-P.** (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. *Plant J* **10**: 331-341.
- Segonzac, C. und Zipfel, C.** (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr Opin Microbiol* **14**: 54-61.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B. und Sheen, J.** (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* **4**: 17-27.
- Sims, A.H., Dunn-Coleman, N.S., Robson, G.D. und Oliver, S.G.** (2004). Glutamic protease distribution is limited to filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett* **239**: 95-101.
- 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., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* **20**: 299-312.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathol* **83**, 843-850.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**: 347-355.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203.
- Song, J., Tan, H., Perry, A.J., Akutsu, T., Webb, G.I., Whisstock, J.C. und Pike, R.N.** (2012). PROSPER: an integrated feature-based tool for predicting protease substrate cleavage sites. *PLoS ONE* **7**: e50300.
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A.L. und Kamoun, S.** (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 1654-1659.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A. und Hawes, C.** (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* **1**: 2019-2025.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**: 61-67.
- Stergiopoulos, I. und de Wit, P.J.G.M.** (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 233-263.
- Takken, F.L., Albrecht, M. und Tameling, W.I.** (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 383-390.
- Taylor, M.A.J., Baker, K.C., Briggs, G.S., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Pratt, K.A., Revell, D.F., Freedman, R.B. und Goodenough, P.W.** (1995). Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng* **8**: 59-62.
- Tian, M., Benedetti, B. und Kamoun, S.** (2005). A second kazal-Like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* **138**: 1785-1793.
- Tian, M., Huitema, E., Cunha, L. da, Torto-Alalibo, T. und Kamoun, S.** (2004). A kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* **279**: 26370-26377.

- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E. und Kamoun, S.** (2007). A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato Papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* **143**: 364-377.
- 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.
- Turner, T.R., James, E.K. und Poole, P.S.** (2013). The plant microbiome. *Genome Biol* **14**: 209.
- Tyler, B.M. et al.** (2006). *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**: 1261-1266.
- Valverde, M.E., Paredes-López, O., Pataky, J.K., Guevara-Lara, F. und Pineda, T.S.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source - biology, composition, and production. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**: 191-229.
- Varrot, A., Basheer, S.M. und Imberty, A.** (2013). Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Curr Opin Struct Biol* **23**: 678-685.
- White, D.G.** (1999). Compendium of corn diseases, 3rd edition. VII + 78 pp.
- 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.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J. und Zhou, J.-M.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**: 74-80.
- Zimmerman, M., Yurewicz, E. und Patel, G.** (1976). A new fluorogenic substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* **70**: 258-262.
- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 10-16.
- Zipfel, C. und Felix, G.** (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* **8**: 353-360.
- Zwirgmaier, K., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H.** (2004). Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization - RING-FISH. *Mol Microbiol* **51**: 89-96.

6 Anhang

Tab. 10: Verwendete *U. maydis*-Stämme.

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz ¹	Referenz
SG200	a1mfa2bW2 bE1	P	Kämper <i>et al.</i> , 2006
SG200 Δ pit2	a1mfa bW2bE1 Δ um01375::hph	P, H	Doehlemann <i>et al.</i> , 2011
SG200 Δ pit2-pit2	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375]ip ^s	P, H, C	Doehlemann <i>et al.</i> , 2011
SG200 Δ pit2-pit2-mCherry	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375:mcherry]ip ^s	P, H, C	Doehlemann <i>et al.</i> , 2011
SG200 Δ pit2-pit2 ^{Δ44-57}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{Δ44-57}]ip ^s	P, H, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200 Δ pit2-pit2 ^{mut49-53}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{mut49-53}]ip ^s	P, H, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200-pit2 ^{Δ44-57} -mCherry	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{Δ44-57} :mcherry]ip ^s	P, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200-pit2 ^{mut49-53} -mCherry	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{mut49-53} :mcherry]ip ^s	P, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200-pit2-mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375:mcherry:HA]ip ^s	P, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200-pit2 ^{Δ44-57} -mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{Δ44-57} :mcherry:HA]ip ^s	P, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200-pit2 ^{mut49-53} -mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{mut49-53} :mcherry:HA]ip ^s	P, C	Mueller <i>et al.</i> , 2013
SG200 Δ pit2-UmPID14	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2-UmPID14]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-UmPID14-mCherry	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::UmPID14:mCherry]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UhPID14	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2-UhPID14]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-UhPID14-mCherry	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::UhPID14:mCherry]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-SrPID14	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2-SrPID14]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit

SG200-SrPID14-mCherry	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::SrPID14:mCherry]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-MpPID14	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2-MpPID14]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-MpPID14-mCherry	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::MpPID14:mCherry]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UhPit2	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::uh02064]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-UhPit2-mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::uh02064:mcherry:HA]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-SrPit2	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::sr10529]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-SrPit2-mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::sr10529:mcherry:HA]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-MpPit2	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::mp4_3204_1]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-MpPit2-mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::mp4_3204_1:mcherry:HA]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UhPit2 ^{UmPID14}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::uh02064 ^{UmPID14}]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-UhPit2 ^{UmPID14} -mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::uh02064 ^{UmPID14} :mcherry:HA]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-SrPit2 ^{UmPID14}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::sr10529 ^{UmPID14}]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200-SrPit2 ^{UmPID14} -mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::sr10529 ^{UmPID14} :mcherry:HA]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-MpPit2 ^{UmPID14}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::mp4_3204_1 ^{UmPID14}]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200 - MpPit2 ^{UmPID14} -mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::mp4_3204_1 ^{UmPID14} :mcherry:HA]ip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{UmPID14}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{UmPID14}]ip ^s	P, H, C	diese Arbeit

SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{UhPID14} _mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{UhPID14} :mCherry:HA]jip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{SrPID14}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{SrPID14}]jip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{SrPID14} _mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{SrPID14} :mCherry:HA]jip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{MpPID14}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{MpPID14}]jip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{MpPID14} _mCherry-HA	a1mfa2 bW2bE1 ip'[Ppit2::um01375 ^{MpPID14} :mCherry:HA]jip ^s	P, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{PIDmutUh1}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{PID14m} _{utUh1}]jip ^s	P, H, C	diese Arbeit
SG200 Δ pit2-UmPit2 ^{PIDmutUh2}	a1mfa2 bW2bE1 Δ um01375::hph ip'[Ppit2::um01375 ^{PID14m} _{utUh2}]jip ^s	P, H, C	diese Arbeit

¹Phleomycin (P), Hygromycin (H), Carboxin (C)

Tab. 11: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
KL259	CathBII_Xba_fw	GCTCTAGAATGGGCGGCG AACTGCTGCT	Amplifikation von NP_001150152
OCFH90	CP1A_Xba_fw	GTATCTAGAATGGCTGCCT CCACCACG	Amplifikation von NP_001148706
OCFH92	XCP2_Xba_fw	CTCTAGAATGGCTTGGTCT TGTGCTCG	Amplifikation von NP_001149806
OCFH94	CP2_Xba_fw	ATCTAGAATGGCCCCACG CCGCCTG	Amplifikation von NP_001105479
ODA31	Pit2_Xho_fw	GACTCGAGATTCCGGTGC GTCGATCG	Amplifikation von um01375
ODA65	CP2-NdeI-fw	GACATATGCGTGCACCC GGCTCGGC	Amplifikation von NP_001105479 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
ODA66	CP2-BamHI-rv	TGGATCCTCATGCGACAAT AGGGTAGG	Amplifikation von NP_001105479 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
ODA67	Cp2_Nde_fw	GGCATATGAACTCCGGCT TCGCGGAC	Amplifikation von NP_001105479
ODA68	Cp2_Hind_rv	CCAAGCTTTGCGACAATAG GGTAGGATGC	Amplifikation von NP_001105479
OGU85	01375-ATS-rv	TTGAATTCTTATCCAGAG TGACCACATCTCCG	Amplifikation von um01375

Oma3	CP2-Mut1	CAGGGCCACTGTGGATCA GGCTGGACCTTCAGCACT ACTG	Erzeugung von Punktmutationen in NP_001105479
Oma4	CP2-Mut2	CTACACCGATGGATGTGA ACGGCGCTGTTCTGGCTG TTGGCTAC	Erzeugung von Punktmutationen in NP_001105479
Oma5	CP2-Mut3	CTACTGGCTCATCAAGGG CTCATGGGGCGCTGACTG	Erzeugung von Punktmutationen in NP_001105479
Oma31	Pit2_del44- 57_fw	GGCAAGGAACCTGACAAC GG	Herstellung von pGBKT7- UmPit2 ^{Δ44-57} bzw. p123- Ppit2-UmPit2 ^{Δ44-57}
Oma32	Pit2_del44- 57_rv	GCCAGCAGCCGAGCTCAT TGA	Herstellung von pGBKT7- UmPit2 ^{Δ44-57} bzw. p123- Ppit2-UmPit2 ^{Δ44-57}
Oma33	Pit2_del49- 53_fw	ACAGGTTTCGCTCGGCAAG GAAC	Herstellung von pGBKT7- UmPit2 ^{Δ49-53} bzw. p123- Ppit2-UmPit2 ^{Δ49-53}
Oma34	Pit2_del49- 53_rv	TCTCCGTTGAGCTTGCC AG	Herstellung von pGBKT7- UmPit2 ^{Δ49-53} bzw. p123- Ppit2-UmPit2 ^{Δ49-53}
Oma36	UmPit2_Xbal_rv	GTATCTAGATCCCAGATGA CCACATCTC	Amplifikation von um01375 ohne Stopcodon
Oma41	CP2_HA_Sac_ rv	GAGCTCTTAAGCGTAATCT GGAACATCGTATGGGTAT GCGACAATAGGGTAGGAT G	Amplifikation von NP_001105479
Oma42	CP1A-BamHI-rv	TATGGATCCTCATGCGCTG CTCTTCATGC	Amplifikation von NP_001148706 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma43	CP1A-NdeI-fw	ATACATATGCGCGCCACCT ACCTCGGCGCC	Amplifikation von NP_001148706 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma45	CP1A_HA_SacI _rv	GTGGAGCTCTTAAGCGTA ATCTGGAACATCGTATGG GTATGCGCTGCTCTTCATG CCGT	Amplifikation von NP_001148706
Oma46	CP1B-BamHI-rv	TATGGATCCTCATGCGCTG CTCTTCATGCCATCAGCAG C	Amplifikation von NP_001149658 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma47	CP1B-NdeI-fw	ATACATATGCGCGCCACCT ACCTCGGCGT	Amplifikation von NP_001149658 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma49	CatB-BamHI-rv	TGTGGATCCTTAAACTATA GCTCTTCCAACG	Amplifikation von NP_001150152 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma50	CatB-NdeI-fw	GCGCATATGAATGCACTAA	Amplifikation von NP_001150152 (nur

		GCAATGTTCT	katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma51	CatBII_HA_SacI_rv	GAGGAGCTCTTAAGCGTA ATCTGGAACATCGTATGG GTAAACTATAGCTCTTCCA ACGG	Amplifikation von NP_001150152
Oma52	XCP2-NdeI-fw	ATACATATGAAGGCCACCT ACCTGGGCCT	Amplifikation von NP_001149806 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma53	XCP2-BamHI-rv	TATGGATCCTCAATGGTCC TTGGTCGGGT	Amplifikation von NP_001149806 (nur katalytische Domäne) für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma54	XCP2_HA_Sac_rv	GTGGAGCTCTTAAGCGTA ATCTGGAACATCGTATGG GTAATGGTCCTTGGTCGG GTAGGA	Amplifikation von NP_001149806
Oma90	Pit2_Mut49-53	CTGGCAAGCTCAACCGGA GAGGAGGAGCCGGCGGC ACAGGTTTCGCTCGGCAAG GAA	Erzeugung von Punktmutationen in um01375
Oma92	UhPit2_Xba_rv	CACTCTAGACTAAGACTTC TTGCTGCTGC	Amplifikation von uh02064
Oma96	SrPit2_Xba_rv	CACTCTAGATCAGTGGCTC TTGTACCCAA	Amplifikation von sr10529
Oma100	Pit2_NcoI_fw	CGTCCATGGTTCGGTGC GTCGATCGCTCTC	Amplifikation von um01375 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma104	Ppit2_rv	TATCCCGGGATCCGCGGT GCTGCGTTTGGTCGTTT GC	Herstellung von p123_Ppit2/-mCherry
Oma105	Tnos_fw	ATACCCGGGCGGCCGCTA GCTCTAGAGCCGCCCGGC TGCAGATCGT	Herstellung von p123_Ppit2
Oma106	RSIATA_fw	ATACCCGGGCGGCCGCTA GCTCTAGAACGCTCGATC GCCACCGCCAT	Herstellung von p123_Ppit2-mCherry
Oma107	Pit2_SP_fw	ATACCGCGGATGCTGTTTC GCTCAGCCTTTGTTCTGCT CATCGTGGCCTTTGCAAGT GCATGCCTGGTGCAACAT GTTCAAGCTATTCCGCC GGGATA	Klonierung des Signalpeptids von um01375
Oma108	Pit2_SP_rv	TATCCCGGGCGGAATAGC TTGAACATGTTGCACCAGG CATGCACTTGCAAAGGCC ACGATGAGCAGAACAAAG GCTGAGCGAAACAGCATC CGCGGTAT	Klonierung des Signalpeptids von um01375
Oma109	UhPit2_Xma_fw	TGTCCCGGGAACAGACCT TTACGCAGAGC	Amplifikation von uh02064
Oma110	UhPit2_Xba_rv2	GCGTCTAGAATAGACTTCT TGCTGCTGCTGC	Amplifikation von uh02064 ohne Stopcodon

Oma111	SrPit2_Xma_fw	TATCCCGGGATGCCAGCC ATGCGTCGATC	Amplifikation von sr10529
Oma112	SrPit2_Xba_rv2	GCGTCTAGAATGTGGCTC TTGTACCCAATGG	Amplifikation von sr10529 ohne Stopcodon
Oma117	SrPID14fw1	AGACCCGGGATGAAGCTC GCGCGCCGCTGGTTCTTC GACTTCGGAGGCGCACTG TAATCTAGAATAT	Klonierung von SrPID14
Oma118	SrPID14rv1	ATATTCTAGATTACAGTGC GCCTCCGAAGTCGAAGAA CCAGCGGCGCGGAGCTT CATCCCGGGTCT	Klonierung von SrPID14
Oma119	MpPit2_Xma_fw	TATCCCGGGGGCCGAATC CAAGCTGTACC	Amplifikation von mp4_3204_1
Oma120	MpPit2_Xba_rv1	TGTTCTAGATTACTGCGAA AAAGTGACCC	Amplifikation von mp4_3204_1
Oma121	MpPit2_Xba_rv2	TGTTCTAGACGCTGCGAAA AAGTGACCCAAA	Amplifikation von mp4_3204_1 ohne Stopcodon
Oma122	SrPID14fw2	AGACCCGGGATGAAGCTC GCGCGCCGCTGGTTCTTC GACTTCGGAGGCGCACTG AATCTAGAATAT	Klonierung von SrPID14 ohne Stop-Codon
Oma123	SrPID14rv2	ATATTCTAGATTCAGTGCG CCTCCGAAGTCGAAGAAC CAGCGGCGCGGAGCTTC ATCCCGGGTCT	Klonierung von SrPID14 ohne Stop-Codon
Oma124	UhPID14fw1	AGAGCCCGGGATGAAGCT CCACCGACGATGGTACTTT CTCTGGCCCGGCTCACTT TAATCTAGAATAT	Klonierung von UhPID14
Oma125	UhPID14rv1	ATATTCTAGATTAAGTGA GCCGGGCCAGAGAAAGTA CCATCGTCGGTGGAGCTT CATCCCGGGTCT	Klonierung von UhPID14
Oma126	UhPID14fw2	AGAGCCCGGGATGAAGCT CCACCGACGATGGTACTTT CTCTGGCCCGGCTCACTT CATCTAGAATAT	Klonierung von UhPID14 ohne Stop-Codon
Oma127	UhPID14rv2	ATATTCTAGATGAAGTGAG CCGGGCCAGAGAAAGTAC CATCGTCGGTGGAGCTTC ATCCCGGGTCT	Klonierung von UhPID14 ohne Stop-Codon
Oma128	UmPID14fw1	AGAGCCCGGGATGAAGCT CAACCGGAGATGGTGGTT CGGCTTCACAGGTTTCGCT CTAATCTAGAATAT	Klonierung von UmPID14
Oma129	UmPID14rv1	ATATTCTAGATTAGAGCGA ACCTGTGAAGCCGAACCA CCATCTCCGGTTGAGCTTC ATCCCGGGTCT	Klonierung von UmPID14
Oma130	UmPID14fw1	AGAGCCCGGGATGAAGCT CAACCGGAGATGGTGGTT CGGCTTCACAGGTTTCGCT	Klonierung von UmPID14 ohne Stop-Codon

		CTTTCTAGAATAT	
Oma131	UmPID14rv1	ATATTCTAGAAAGAGCGAA CCTGTGAAGCCGAACAC CATCTCCGGTTGAGCTTCA TCCCGGGCTCT	Klonierung von UmPID14 ohne Stop-Codon
Oma132	UhPit2_Sacl_fw	CTCGAGCTCAACAGACCTT TACGCAGAGC	Amplifikation von uh02064
Oma133	UhPit2_Eco_rv	GAGGAATTCCTAAGACTTC TTGCTGCTGC	Amplifikation von uh02064 für Hefe-Zwei-Hybrid- Analysen
Oma133	UhPit2_Eco_rv	GAGGAATTCCTAAGACTTC TTGCTGCTGC	Amplifikation von uh02064
Oma134	SrPit2_Sacl_fw	ATAGAGCTCATGCCAGCC ATGCGTCGATC	Amplifikation von sr10529
Oma135	SrPit2_Eco_rv	CACGAATTCTCAGTGGCTC TTGTACCCAATG	Amplifikation von sr10529 für Hefe-Zwei-Hybrid- Analysen
Oma135	SrPit2_Eco_rv	CACGAATTCTCAGTGGCTC TTGTACCCAATG	Amplifikation von sr10529
Oma135	MpPit2_Sacl_fw	ATAGAGCTCGGCCGAATC CAAGCTGTACC	Amplifikation von mp4_3204_1
Oma136	MpPit2_Eco_rv	GCGGAATTCTTACTGCGAA AAAGTGACCC	Amplifikation von mp4_3204_1
Oma137	MpPit2_Eco_rv	GCGGAATTCTTACTGCGAA AAAGTGACCC	Amplifikation von mp4_3204_1 für Hefe-Zwei- Hybrid-Analysen
Oma138	MpPID14fw1	AGACCCGGGATGAAGCTC AGCCGTAGATGGATGTTT GGCTGGGATGGCTCACTC TAATCTAGAATA	Klonierung von MpPID14
Oma139	MpPID14rv1	TATTCTAGATTAGAGTGAG CCATCCCAGCCAAACATC CATCTACGGCTGAGCTTCA TCCCGGGTCT	Klonierung von MpPID14
Oma140	MpPID14fw2	AGACCCGGGATGAAGCTC AGCCGTAGATGGATGTTT GGCTGGGATGGCTCACTC AATCTAGAATA	Klonierung von MpPID14 ohne Stop-Codon
Oma141	MpPID14rv2	TATTCTAGATTGAGTGAGC CATCCCAGCCAAACATCCA TCTACGGCTGAGCTTCATC CCGGGTCT	Klonierung von MpPID14 ohne Stop-Codon
Oma142	UmPit2- UhPID14_fw	AAGCTCCACCGACGATGG TACTTTCTCTGGCCCGGCT CACTTGGAAGGAACCTG ACAACGGCCAAGTACAG	Einfügen der PID14 von uh02064 in um01375
Oma143	UmPit2- UhPID14_rv	AAGTGAGCCGGGCCAGAG AAAGTACCATCGTCGGTG GAGCTTGCCAGCAGCCGA GCTCATTGAGGCATCGG	Einfügen der PID14 von uh02064 in um01375
Oma144	UmPit2- SrPID14_fw	AAGCTCGCGCGCCGCTGG TTCTTCGACTTCGGAGGC GCACTGGGCAAGGAACCT GACAACGGCCAAGTACAG	Einfügen der PID14 von sr10529 in um01375

		AT	
Oma145	UmPit2-SrPID14_rv	CAGTGCGCCTCCGAAGTC GAAGAACCAGCGGCGCGC GAGCTTGCCAGCAGCCGA GCTCATTGAGGCATCGGT A	Einfügen der PID14 von sr10529 in um01375
Oma146	UmPit2-MpPID14_fw	AAGCTCAGCCGTAGATGG ATGTTTGGCTGGGATGGC TCACTCGGCAAGGAACCT GACAACGGCCAAGTACAG AT	Einfügen der PID14 von mp4_3204_1 in um01375
Oma147	UmPit2-MpPID14_rv	GAGTGAGCCATCCCAGCC AAACATCCATCTACGGCTG AGCTTGCCAGCAGCCGAG CTCATTGAGGCATCGG	Einfügen der PID14 von mp4_3204_1 in um01375
Oma150	Pit2-SaclI-fw	TATCCGCGGATGCTGTTTC GCTCAGCCTTTG	Amplifikation von um01375
Oma150	Pit2_SaclI_fw	TATCCGCGGATGCTGTTTC GCTCAGCCTTTG	Amplifikation von um01375
Oma151	Pit2_XbaI_rv	GCGTCTAGATTATCCAG ATGACCACATCTCCG	Amplifikation von um01375
Oma171	mCherryHA-rv	TATGCGGCCGCTTAAGCG TAATCTGGAACATCGTATG GGTACTTGACAGCTCGTC CATGC	Einbringen eines HA-tags in mCherry-Sequenz
Oma186	UhPit2_NdeI_fw	GTGCATATGAACAGACCTT TACGCAGAGCC	Amplifikation von uh02064 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma187	SrPit2_NdeI_fw	ATACATATGATGCCAGCCA TGCGTGCATCG	Amplifikation von sr10529 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma188	MpPit2_NdeI_fw	ATACATATGGGCCGAATCC AAGCTGTACCTCG	Amplifikation von mp4_3204_1 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen
Oma189	UhPit2-UmPID14_fw	AAGCTCAACCGGAGATGG TGTTTCGGCTTCACAGGTT CGCTCGCTCCCAAACCTC CACGTGA	Einfügen der PID14 von um01375 in uh02064
Oma190	UhPit2-UmPID14_rv	GAGCGAACCTGTGAAGCC GAACCACCATCTCCGTT GAGCTTGGTGATGTAATTG TCGTTGT	Einfügen der PID14 von um01375 in uh02064
Oma191	SrPit2-UmPID14_fw	AAGCTCAACCGGAGATGG TGTTTCGGCTTCACAGGTT CGCTCTCGCGCTGGGACG TCGCGCC	Einfügen der PID14 von um01375 in sr10529
Oma192	SrPit2-UmPID14_rv	GAGCGAACCTGTGAAGCC GAACCACCATCTCCGTT GAGCTTCCGAGTGTGCTT CCACCCG	Einfügen der PID14 von um01375 in sr10529
Oma193	MpPit2-UmPID14_fw	AAGCTCAACCGGAGATGG TGTTTCGGCTTCACAGGTT CGCTCTCACCTGCGCCCA AATACAG	Einfügen der PID14 von um01375 in mp4_3204_1

Oma194	MpPit2- UmPID14_rv	GAGCGAACCTGTGAAGCC GAACCACCATCTCCGGTT GAGCTTGGATGCCCTATC CGACGCAG	Einfügen der PID14 von um01375 in mp4_3204_1
Oma197	UmPIDmut1_fw	GTGGTTCCTCTTCCCGG TTCGCTCGGCAA	Einfügen von Punktmutationen in um01375
Oma198	UmPIDmut1_rv	CATCTCCGGTGGAGCTTG CCAGCAG	Einfügen von Punktmutationen in um01375
Oma199	UmPIDmut2_fw	GGAGATGGTACTTCCGGCT GGACAGGTTCCG	Einfügen von Punktmutationen in um01375
Oma200	UmPIDmut2_rv	GGTTGAGCTTGCCAGCAG CCGAGCTCATTG	Einfügen von Punktmutationen in um01375
Oma201	UmPit2_Xmal_f w	ATACCCGGGATTCGGGTG CGTCGATCGCTC	Amplifikation von um01375
STO16	CP2-Ndel-fw	GGAATTCATATGCCCAAC TCCGGCTTCGCGGACTCC	Amplifikation von NP_001105479 (Volllänge, ohne Signalpeptid) für Hefe- Zwei-Hybrid-Analysen
STO17	CP2-BamHI-rv	CGCGATCCTCATGCGACA ATAGGGTAGG	Amplifikation von NP_001105479 (Volllänge, ohne Signalpeptid) für Hefe- Zwei-Hybrid-Analysen

Tab. 12: Hergestellte Pit2-Chimäre.

Name	Sequenz	Beschreibung
UmPit2	...SAAGKLNRRWWFGFTGSLGKEP...	Aminosäurereste 40-61 von Pit2 aus <i>U. maydis</i>
UhPit2	...NYITKLHRRWYFLWPGSLAPKP...	Aminosäurereste 39-60 von Pit2 aus <i>U. hordei</i>
SrPit2	...STLGKLARRWFFDFGGALSRWD...	Aminosäurereste 43-64 von Pit2 aus <i>S. reilianum</i>
MpPit2	...DRASKLSRRWMFGWDGSLSPAP...	Aminosäurereste 41-62 von Pit2 aus <i>M. pennsylvanicum</i>
UmPit2-UhPID14	...SAAGKLHRRWYFLWPGSLGKEP...	Chimäre aus UmPit2 und UhPID14
UmPit2-SrPID14	...SAAGKLARRWFFDFGGALGKEP...	Chimäre aus UmPit2 und SrPID14
UmPit2-MpPID14	...SAAGKLSRRWMFGWDGSLGKEP...	Chimäre aus UmPit2 und MpPID14

UhPit2-UmPID14	...NYITKLNRRWWFGFTGSLAPKP...	Chimäre aus UhPit2 und UmPID14
SrPit2-UmPID14	...STLGKLNRRWWFGFTGSLSRWD...	Chimäre aus SrPit2 und UmPID14
MpPit2-UmPID14	...DRASKLNRRWWFGFTGSLSPAP...	Chimäre aus MpPit2 und UmPID14

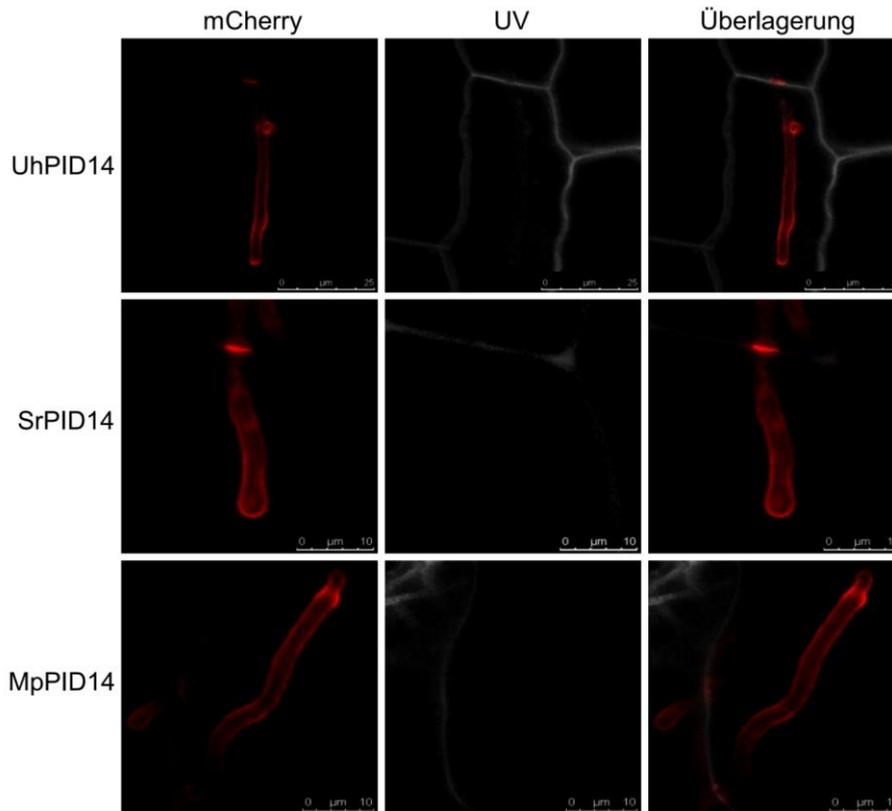


Abb. 32: Lokalisation von PID14-Orthologen. Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die Sekretion von UhPID14-mCherry (Oben), SrPID14-mCherry (Mitte) und MpPID14-mCherry (Unten) zeigen. Rot: mCherry-Signal. Grau: Durch UV-Laser induzierte Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand.

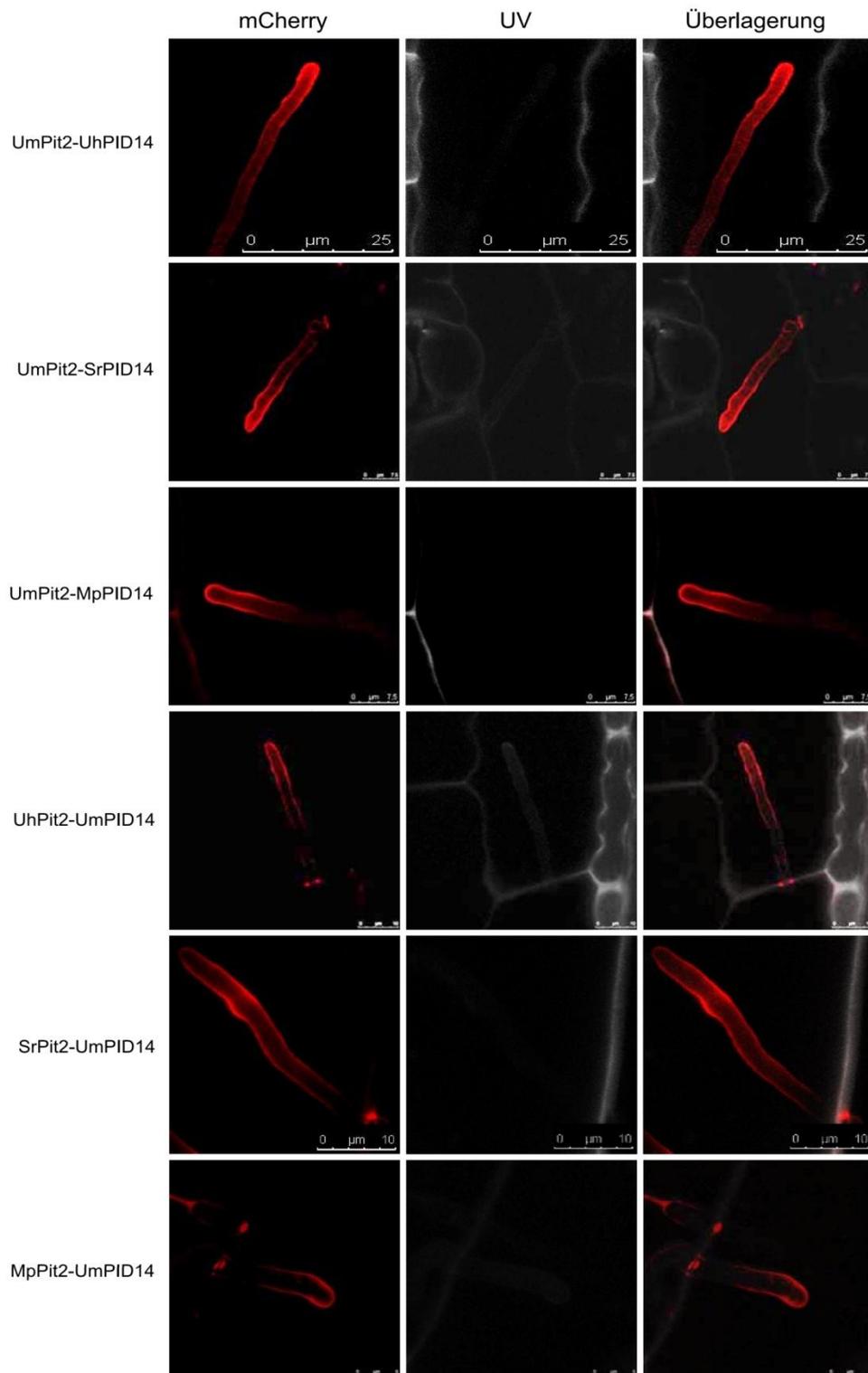


Abb. 33: Lokalisation von Pit2-Chimären. Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die Sekretion von UmPit2-UhPID14-mCherry, UmPit2-SrPID14-mCherry, UmPit2-MpPID14-mCherry, UhPit2-UmPID14-mCherry, SrPit2-UmPID14-mCherry und MpPit2-UmPID14-mCherry zeigen. Rot: mCherry-Signal. Grau: Durch UV-Laser induzierte Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand.

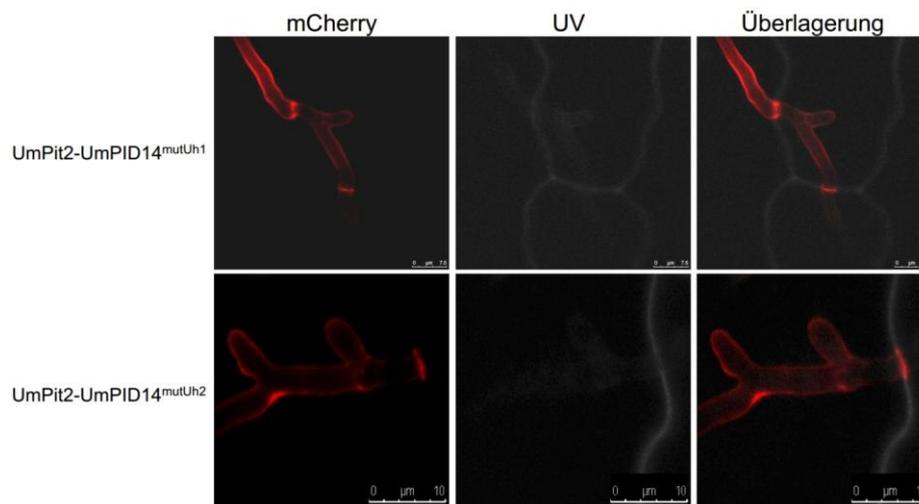


Abb. 34: Lokalisation von UmPit2-Versionen deren PID14-Regionen teilweise durch die aus UhPID14 ersetzt wurden, in SG200 Δ pit2. Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die Sekretion von UmPit2- PID14^{mutUh1}-mCherry (Oben) und UmPit2- PID14^{mutUh2}-mCherry (Unten) zeigen. Rot: mCherry-Signal. Grau: Durch UV-Laser induzierte Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand.

Abgrenzung der Eigenleistung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von mir selbständig ohne andere als die hier aufgeführte Hilfe durchgeführt. Dabei erfolgte die Konzipierung der Experimente und die Erstellung der Publikation „Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2“ in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer PD Dr. Gunther Döhlemann. Im Folgenden werden weitere an dieser Arbeit beteiligten Personen sowie deren experimentellen Beiträge genannt:

Sebastian Ziemann

hat im Rahmen seiner Masterarbeit das Co-IP-Experiment mit GST-Pit2 und CP2-HA-haltigem Blattextrakt aus transient mit *A. tumefaciens* transformierten *N. benthamiana*-Pflanzen, das zur Anfertigung von Abb. 6B führte, durchgeführt. Des Weiteren wurden von ihm sämtliche heterologen Expressionen von CP1A, CP2, XCP2 und CatB in *N. benthamiana*-Pflanzen und die zugehörigen Protease-Aktivitätstests mit den daraus isolierten Proteasen durchgeführt. Auf Grundlage dieser Daten wurden Abb. 13, 19C und 19D erstellt.

Marlen Breuer

hat im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Klonierung der Konstrukte, sowie die Herstellung der *U. maydis*-Mutanten, die UhPit2-UmPID14, SrPit2-UmPID14 und MpPit2-UmPID14 im SG200 Δ pit2-Hintergrund exprimieren hergestellt. Auch die Herstellung der Konstrukte und entsprechender *U. maydis*-Mutanten, die die eben genannten Konstrukte als mCherry-markierte Versionen beinhalten, wurde von ihr durchgeführt:

Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei Gunther Döhlemann für die Vergabe des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, sowie die insgesamt äußerst lehrreiche Zeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitgliedern meiner Prüfungskommission Frau Prof. Dr. Kahmann, Herrn Prof. Dr. Uwe Maier und Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl. Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl danke ich außerdem für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Bölker, Herrn Prof. Dr. Martin Thanbichler und Frau PD Dr. Sonja-Verena Albers für die nützlichen Tipps und Anregungen im Rahmen der Komitee-Treffen als Mitglieder meines *IMPRS-Thesis Advisory Committee*.

Ansonsten möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Döhlemann, Zuccharo und Kahmann für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere auch bei Ria, Anita und Stefan, durch die der Laboralltag ungemein erleichtert wurde.

Weiterhin danken möchte ich Sebastian Ziemann, Marlen Breuer und Bastian Kemmerich, die im Rahmen ihrer Master- bzw. Bachelorarbeit oder in ihrer Tätigkeit als HiWi einen maßgeblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Auch danke ich Zippi und Robin für die „genussvolle“ Zeit und die vielen lustigen Stunden inner- und außerhalb des Labors.

Zusätzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn, der im Laufe meines Biologie-Studiums mein Interesse für das Gebiet der Phythopathologie geweckt hat und mir dabei behilflich war, auf diesem Weg weiterzugehen.

Bei meiner Familie und meinen Freunden, ganz besonders bei Simone und meiner Tochter Emilia, möchte ich mich für die Unterstützung und den Rückhalt während meines ganzen Studiums, sowie im Verlauf meiner Doktorarbeit bedanken.

