

**Identifizierung und Charakterisierung
organspezifischer *Ustilago maydis*
Effektoren**



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lena Schilling

aus Mühlheim am Main

Marburg/Lahn, 2014

**Identifizierung und Charakterisierung
organspezifischer *Ustilago maydis*
Effektoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lena Schilling

aus Mühlheim am Main

Marburg/Lahn, 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2011 bis Dezember 2014 unter der Betreuung von Prof. 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: 27.01.2015

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Gunther Döhlemann

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2015

Teile dieser Arbeit werden bzw. wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V. and Doehlemann, G. (2014), Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Molecular Plant Pathology*, 15: 780-789. doi: 10.1111/mpp.12133

Redkar, A., Schilling, L., Hoser, R., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, G., and Doehlemann, G. (2014), A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* is Required to Guide Host Cells to Form Tumors in Maize Leaves. *The Plant Cell* (in Revision)

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung organspezifischer *Ustilago maydis* Effektoren“ 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)

(Lena Schilling)

„Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber
wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten
sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben
und muß sich stets auf neue Überraschungen gefaßt machen“

Max Planck
(1858-1947)

Zusammenfassung

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrands, penetriert seine Wirtspflanze *Zea mays* über die Epidermis und induziert nach erfolgreicher Kolonisierung des Wirts eine Tumorbildung in allen oberirdischen Organen der Pflanze. Um das pflanzliche Immunsystem während dieser biotrophen Interaktion effizient zu unterdrücken ist *U. maydis* auf die Sekretion vieler Effektorproteine angewiesen. Die infizierten pflanzlichen Organe weisen physiologische sowie strukturelle Unterschiede auf, was auf organspezifische Infektionsstrategien seitens *U. maydis* schließen lässt. Diese Annahme wurde bereits durch eine Transkriptionsanalyse infizierter Maispflanzen gestärkt, die gezeigt hat, dass die Tumorbildung in unterschiedlichen Organen, spezifische transkriptionelle Änderungen bei Pathogen und Wirt mit sich bringt.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung organspezifischer *U. maydis* Effektoren. 17 blattspezifische und vier spezifisch in der männlichen Blüte exprimierte Kandidatengene, die für potenziell sekretierte Proteine codieren, wurden selektiert. Deletionsanalysen offenbarten, dass sieben dieser *U. maydis* Gene einen wichtigen Einfluss auf Blattinfektionen haben. Mutanten für zwei Gene zeigten einen Virulenzdefekt bei Infektionen der männlichen Blüte und zwei weitere Gene waren an der Infektion beider getesteten Organe beteiligt. Einer der identifizierten organspezifischen Kandidaten ist der *U. maydis* Effektor Um01829. Das Gen *um01829* wurde sehr stark bei Blattinfektionen, jedoch nur sehr gering im Falle von Infektionen der männlichen Blüte exprimiert. Die *U. maydis* Deletionsmutante SG200 Δ um01829 wies eine reduzierte Virulenz bei Blattinfektionen auf, wo hingegen Infektionen der männlichen Blüte mit dem Wildtyp SG200 vergleichbar waren. Mikroskopische Aufnahmen belegten die prognostizierte Sekretion des Effektors, zudem wurde eine Lokalisation von Um01829 an Zell/Zell-Übergängen und in dem apoplastischen Zwischenraum beobachtet. Darüber hinaus zeigte die Deletionsmutante einen Defekt in der Zell/Zell-Penetration bei Maisblättern vier und acht Tage nach der Infektion. *In vitro* Analysen mit unterschiedlichen 4-Nitrophenyl markierten Substraten belegten, dass es sich bei dem von *um01829* codierten Protein um eine α -L-Arabinofuranosidase handelt. Durch Blattinfektionen mit enzymatisch inaktivem Um01829 konnte der Funktion als α -L-Arabinofuranosidase jedoch ein lediglich partieller Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* zugesprochen werden, was zudem auf weitere bisher noch nicht bekannte virulenzrelevante Funktionen des Effektors schließen lässt.

Summary

Ustilago maydis, the causative agent of corn smut disease, penetrates its host plant *Zea mays* over the epidermis and induces tumor formation in all areal parts of the plant after successful colonization. For efficient suppression of the plant immune system *U. maydis* depends on the secretion of several effector proteins. The infected plant organs differ in structure and physiology, suggesting organ-specific infection structures of *U. maydis*. This assumption was strengthened by transcriptional analysis of infected maize plants that showed organ specific transcriptional differences during tumor formation at pathogen and host.

This thesis focused on the identification and functional characterization of organ-specific *U. maydis* effectors. 17 leave-specific and four tassel-specific induced candidates with a predicted signal peptide were selected. Deletion analyses revealed that seven of these *U. maydis* genes have an important influence in seedling infections, two of them in tassel infections and two are important for virulence in both tested organs.

One of the identified organ-specific candidates is the *U. maydis* effector Um01829. The gene *um01829* was strongly expressed during leave infections, but very weak during colonization of tassels. The *U. maydis* deletion mutant SG200 Δ um01829 showed a reduced virulence at seedling infections, whereas tassel infections were comparable with the wildtype SG200. Microscopic analyses confirmed the predicted secretion of the protein and revealed that it localizes at cell/cell-passages and in the apoplastic space. Additionally it was observed, that the deletion mutant has a significant defect at the cell/cell-passaging at infected maize leaves four and eight days post infection. *In vitro* assays with several 4-nitrophenyl labeled substrates showed that the protein encoded by *um01829* is an α -L-arabinofuranosidase. Seedling infections with enzymatic inactive Um01829 showed a partial virulence-influence of the α -L-arabinofuranosidase function, and suggest additionally further virulence-relevant functions of this effector.

Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AD	Gal4-Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Avr-Protein	Avirulenzprotein
BD	Gal4-Bindedomäne
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	C-Terminus
Cbx	Carboxin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFP	cyan fluorescent protein
CHORD	<i>cysteine- and histidine-rich domain</i>
Clm	Chloramphenicol
CM	<i>complete medium</i>
CS	<i>CHORD-SGT1</i>
C-terminal	Carboxyterminal
CW	Calcofluor white
CWDEs	<i>cell wall degrading enzymes</i>
Cys	Cystein
Da	Dalton
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DIG	Digoxygenin
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
eBiFC	<i>enhanced bimolecular fluorescence complementation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2-Desoxyurudin
EI	Einzelintegration
ETI	<i>effector triggered immunity</i>
ETS	<i>effector triggered susceptibility</i>
evtl	eventuell
FLP	Flippase
FRT	<i>flippase recognition target</i>
fw	<i>Foward</i>
g	Gramm
G	Glycin
Gen	Gentamicin
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
ggf	gegebenen Falls
GH	Glycosyl-Hydrolase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O _{bid.}	Zweifach destilliertes Wasser

HA	Hemagglutinin
His	Histidin
HR	hypersensitive Reaktion
HRGPs	<i>hydroxyprolin-rich-glycoproteins</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hyg	Hygromycin
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie
<i>ip</i>	<i>iron-sulphur protein</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	konserviert
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kDa	Kilodalton
lat.	Lateinisch
Leu	Leucin
LRR	<i>leucin rich repeat</i>
LRR-RLK-Rezeptor	<i>leucin-rich repeat receptor-like kinase</i>
LysM	Lysin-Motiv
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i>
Map	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogenaktivierte Proteinkinase</i>
Mbp	Megabasenpaare
MI	Mehrfachintegration
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
ms	Millisekunde
n	Anzahl
N	Asparagin
NB-LRR	<i>nucleotide binding leucin rich repeat</i>
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriacetic acid
N-terminal	Aminoterminal
OD	optische Dichte
OGs	Oligogalacturonid
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>potato dextrose</i>
PEG	Polyethylenglycol
Pep	<i>protein(s) essential during penetration</i>
PGIPs	Polygalacturonase-Inhibitoren
PGs	Polygalacturonasen
Phleo	Phleomycin
Pit	<i>protein(s) important for tumors</i>
POX	Peroxidase
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> -PCR
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonucleic acid

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
R-Protein	Resistenzprotein
RT	Raumtemperatur
rv	<i>Revers</i>
SA	<i>salicylic acid</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
See1	<i>seedling efficient effector 1</i>
sek	Sekunde
SGS	SGT1 spezifische-Domäne
SGT1	<i>supressor of G2 allele of skp1</i>
SIPK	<i>salicylic acid-induced protein kinase</i>
SP	Signalpeptid
Sr	<i>Sporisorium reilianum</i>
Strp	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyclin
Tin	<i>tumor induced</i>
TPR	tetratricopeptide repeat
Tris	Trishydroxymethylamoniumethan
Trp	Tryptophan
U/min	Umdrehungen pro Minute
Uh	<i>Ustilago hordei</i>
Um	<i>Ustilago maydis</i>
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
WAK1	<i>wall associated kinase1</i>
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
wt	Wildtyp
XEGIPs	Xyloglucan-Endoglucanase inhibitierende Proteine
XEGs	Xyloglucan-spezifische Endoglucanasen
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel
α -L-Araf	α -L-Arabinofuranosyl
β -D-Xylp	β -D-Xylopyranosyl
Δ	Delta
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
4-O-Me- α -D-GlcpA	4-O Methylether

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Infektionsstrategien phytopathogener Pilze.....	1
1.2 <i>Ustilago maydis</i> - Der Erreger des Maisbeulenbrands	2
1.2.1 Sekretierte <i>U. maydis</i> Effektoren.....	6
1.2.2 Organspezifität von sekretierten <i>U. maydis</i> Effektoren	8
1.3 Das pflanzliche Immunsystem	9
1.4 Die pflanzliche Zellwand und die dort lokalisierten Arabinoxylane..	12
1.5 Die Rolle der Zellwand im pflanzlichen Immunsystem	15
1.6 α-L-Arabinofuranosidasen und deren Funktion als Virulenzfaktor ..	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	19
2 Ergebnisse.....	20
2.1 Identifizierung organspezifischer <i>U. maydis</i> Effektoren	20
2.2 Charakterisierung organspezifischer <i>U. maydis</i> Effektoren	24
2.3 Der genetisch nicht komplementierbare <i>U. maydis</i> Deletionsstamm SG200Δum00154	29
2.4 Der organspezifische Effektor <i>um02239</i> (see1).....	32
2.4.1 See1 interagiert mit dem Zellzyklus- und Immunitätsregulator ZmSGT1	33
2.5 Der organspezifische Effektor <i>um01829</i>	38
2.5.1 Appressorienbildung und Penetrationseffizienz der <i>U. maydis</i> Mutante SG200 Δ um01829	40
2.5.2 Sekretion und Lokalisierung des organspezifischen Effektors Um01829	41
2.5.3 Mikroskopische Analyse des Deletionsstamms SG200 Δ um01829	43
2.5.4 Expression und Aufreinigung von Um01829.....	45
2.5.5 Um01829 zeigt eine α -L-Arabinofuranosidase Aktivität	46
2.5.6 Einfluss der enzymatischen Aktivität von Um01829 auf die Virulenz von <i>U. maydis</i>	53
3 Diskussion	55
3.1 Organspezifität der identifizierten und charakterisierten <i>U. maydis</i> Effektoren	55

3.2 Komplementationsproblematik des Deletionstamms SG200Δum00154	58
3.3 See1 interagiert mit dem Zellzyklus- und Immunitätsregulator ZmSGT1	60
3.4 Charakterisierung des organspezifischen Effektors Um01829	64
3.4.1 Um01829 wird während der biotrophen Entwicklung von <i>U. maydis</i> organspezifisch induziert und sekretiert	64
3.4.2 Die Rolle von Um01829 für die Virulenz von <i>U. maydis</i>	65
3.4.3 Um01829 ist eine α-L-Arabinofuranosidase	67
3.5 Ausblick	70
4 Material und Methoden	72
4.1 Material und Bezugsquellen	72
4.1.1 Chemikalien	72
4.1.2 Puffer und Lösungen	72
4.1.3 Enzyme und Antikörper	72
4.1.4 Verwendete Kits und sonstige Materialien	73
4.2 Zellkultivierung	74
4.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	74
4.2.2 Kultivierung von <i>U. maydis</i>	74
4.2.3 Kultivierung von <i>U. maydis</i> für Wachstumstests auf Stressmedien sowie für die Überprüfung des filamentösen Wachstums	75
4.2.4 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	76
4.2.5 Kultivierung von <i>P. pastoris</i>	77
4.2.6 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien- und Pilzkulturen	77
4.3 Stämme, Oligonukleotide und Plasmide	78
4.3.1 <i>E. coli</i> Stämme	78
4.3.2 <i>A. tumefaciens</i> Stämme	78
4.3.3 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	78
4.3.4 <i>P. pastoris</i> Stämme	79
4.3.5 <i>U. maydis</i> Stämme	79
4.3.6 Oligonukleotide	80
4.3.7 Plasmide	80
4.3.7.1 Plasmide zur Klonierung von PCR-Produkten	81
4.3.7.2 Plasmide zur Generierung von stabilen <i>U. maydis</i> Mutanten	81
4.3.7.3 Plasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen	90
4.3.7.4 Plasmide zur transienten Expression von Genen in <i>N. benthamiana</i>	92
4.3.7.5 Plasmide für die Expression der BiFC-Konstrukte in <i>N. benthamiana</i> und in epidermalen Maiszellen	92
4.3.7.6 Plasmide zur Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	94
4.3.7.7 Plasmide zur Herstellung rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i>	94
4.4 Mikrobiologische Methoden	96
4.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	96
4.4.2 Blau-Weiß-Selektion von <i>E. coli</i> Transformanden	97
4.4.3 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	97
4.4.4 Transformation von <i>U. maydis</i>	97
4.4.5 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	98
4.4.6 Transformation von <i>P. pastoris</i>	99
4.4.7 Transformation von epidermalen Maiszellen	100
4.4.8 Induktion von Appressorien <i>in vitro</i>	101

4.5 Molekularbiologische Methoden.....	102
4.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	102
4.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i>	102
4.5.3 Isolierung von <i>U. maydis</i> RNA aus axenischer Kultur.....	103
4.5.4 Isolierungen von <i>U. maydis</i> RNA aus infizierten Maispflanzen.....	104
4.5.5 <i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	104
4.5.5.1 Restriktion	104
4.5.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten.....	105
4.5.5.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	105
4.5.5.4 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion.....	106
4.5.5.5 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren	107
4.5.5.6 Sequenzierung von Nukleinsäuren	107
4.5.6 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	107
4.5.7 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren	108
4.5.8 Southern Analyse	108
4.5.9 cDNA-Synthese	111
4.5.10 Quantitative <i>real-time PCR</i>	111
4.6 Proteinbiochemische Methoden	111
4.6.1 Auftrennung und Nachweis von Proteinen	111
4.6.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western Blot)	113
4.6.3 Coomassie-Proteinfärbung.....	114
4.6.4 Proteinbestimmung nach Bradford.....	115
4.6.5 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	115
4.6.6 Proteinexpression in <i>P. pastoris</i>	116
4.6.7 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)	117
4.6.8 Enzymaktivitäts-Assays mit 4-Nitrophenyl markierten Substraten.....	118
4.6.9 Enzymaktivitäts-Assays mit Azurin gefärbtem Weizenxylooligosaccharid als Substrat.....	119
4.6.10 Co-Immunopräzipitation	120
4.6.11 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)	121
4.6.12 Hefe-Tropftest.....	122
4.7 Pflanzenmethoden	123
4.7.1 Maisvarietäten (<i>Z. mays</i>).....	123
4.7.2 Kultivierung von <i>Z. mays</i>	123
4.7.3 Blatt- und Blüteninfektionen von <i>Z. mays</i> mit <i>U. maydis</i>	123
4.7.4 Quantifizierung von <i>U. maydis</i> Blattinfektionen.....	124
4.7.5 Quantifizierung von <i>U. maydis</i> Blüteninfektionen.....	124
4.7.6 Ermittlung der Penetrationseffizienz	125
4.7.7 Kultivierung von <i>N. benthamiana</i>	125
4.7.8 Infiltration von <i>N. benthamiana</i> mit <i>A. tumefaciens</i>	126
4.8 Mikroskopie	126
4.8.1 Konfokale Mikroskopie	126
4.8.2 Calcofluor white-Färbung	126
4.8.3 Färbung infizierter Maisblattproben mit WGA-AF488 und Propidiumiodid	127
4.9 Bioinformatische Analysen	128
5 Literaturverzeichnis	129
6 Anhang	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Krankheitssymptome von <i>U. maydis</i> infizierten Pflanzen	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	5
Abbildung 3: Expressionsprofil von <i>U. maydis</i> -Genen in unterschiedlichen Pflanzenorganen (Keimling, adultes Blatt, männliche Blüte), drei Tage nach der Infektion.....	9
Abbildung 4: Grundlegende pflanzliche Abwehrreaktionen	12
Abbildung 5: Aufbau der pflanzlichen Zellwand	13
Abbildung 6: Die chemische Struktur von pflanzlichem Xylan	15
Abbildung 7: Expressionsprofil von organspezifischen <i>U. maydis</i> Effektorgenen	23
Abbildung 8: Wachstum von generierten <i>U. maydis</i> Deletionsstämmen auf unterschiedlichen Nährböden.....	25
Abbildung 9: Krankheitssymptome der erstellten <i>U. maydis</i> Mutanten mit einer signifikant reduzierten Virulenz bei Blatt- und/oder Blüteninfektionen	27
Abbildung 10: Krankheitssymptome der erstellten <i>U. maydis</i> Mutanten mit keiner signifikant reduzierten Virulenz bei Blatt- und/oder Blüteninfektionen.	28
Abbildung 11: Krankheitssymptome der erstellten <i>U. maydis</i> Deletionsmutanten an Maisblättern.....	29
Abbildung 12: Infektions-und Expressionsanalysen von <i>um00154</i> und den diesbezüglich generierten Deletions- und Komplementationstämmen	32
Abbildung 13: Domänen von See1 und SGT1	34
Abbildung 14: Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit See1 und SGT1	35
Abbildung 15: Co-Immunopräzipitation von See1-Myc und SGT1-HA	36
Abbildung 16: <i>In vivo</i> bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von See1 und SGT1	37
Abbildung 17: Sequenzvergleich von Um01829 aus <i>U. maydis</i> mit den Homologen in <i>U. hordei</i> / <i>S. reilianum</i> und Expressionsprofil von <i>um01829</i>	38
Abbildung 18: Appressorienbildung (A) und Penetrationseffizienz (B) der Mutante SG200 Δ um01829.....	41
Abbildung 19: Sekretion und Lokalisierung von Um01829	43
Abbildung 20: Die Deletionsmutante SG200 Δ um01829 zeigt einen Defekt bei der Zell/Zell-Penetration	45
Abbildung 21: Heterologe Expression und Aufreinigung von Um01829	46
Abbildung 22: Schematische Darstellung des Proteins Um01829 mit eingefügten Punktmutationen.....	47
Abbildung 23: Enzymaktivität von Um01829 unter Verwendung von Azurin gefärbtem Weizenxylan als Substrat	49
Abbildung 24: Enzymaktivität von Um01829 unter Verwendung des synthetischen Substrats 4-Nitrophenyl α -L- Arabinofuranoside	50
Abbildung 25: Enzymaktivität von Um01829 unter Verwendung der synthetischen Substrate 4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside (A), 4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside (B) und 4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside (C)	52
Abbildung 26: Vereinfachte Darstellung eines pflanzlichen Xylans und der Verbindungen die von Um01829 hydrolysiert werden können	53
Abbildung 27: Virulenz von <i>U. maydis</i> Stämmen mit enzymatisch inaktiven Um01829	54
Abbildung 28: DNA- und Protein-Größenstandards	73
Abbildung 29: Erstellung des Deletionsstamms SG200 Δ um00154 (mit FRT-Sequenz) (A) und des Insertionsstamms SG200-Insertion-um00154 (B)	80
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Funktion von eBiFC	122
Abbildung 31: Kategorien für die Quantifizierung der Krankheitssymptome an der männlichen Maisblüte	125
Abbildung 32: Expressionsnachweis der einzelnen Proteinregionen von See1 und SGT1....	148

Abbildung 33: SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen einer Ni-NTA Aufreinigung der mutierten Versionen von Um01829 149

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kandidatengene für organspezifische <i>U. maydis</i> Effektoren.....	21
Tabelle 2: <i>U. maydis</i> Gene die für Proteine mit einer prognostizierten Funktion als α -L-Arabinofuranosidase oder Endo-1,4- β -Xylanase codieren	39
Tabelle 3: Übersicht der für die Enzymaktivitäts-Assays verwendeten Substrate	53
Tabelle 4: Für Bakterienkulturen verwendete Antibiotika	74
Tabelle 5: Für die Kultivierung von <i>U. maydis</i> Stämmen verwendete Antibiotika.....	75
Tabelle 6: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	78
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	114
Tabelle 8: Bedingungen zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	116
Tabelle 9: Bedingungen zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine in <i>P. pastoris</i>	117
Tabelle 10: Klassifizierung der Symptome infizierter Maispflanzen	124
Tabelle 11: Verwendete Anregungs- und Detektionswellenlängen.....	126
Tabelle 12: Erwartet Größen für den Expressionsnachweis der einzelnen Proteinregionen von See1 und SGT1.....	148
Tabelle 13: Verwendete <i>U. maydis</i> Stämme	150
Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide.....	152

1 Einleitung

1.1 Infektionsstrategien phytopathogener Pilze

Ein erheblicher Teil der jährlichen Verluste an Nutzpflanzen wird durch Pilzinfektionen verursacht, was große wirtschaftliche Schäden mit sich trägt (Birren, 2003). Um mit dem jeweiligen Wirt eine Interaktion zu etablieren, haben phytopathogene Pilze im Laufe der Evolution unterschiedliche Infektions- und Entwicklungsstrategien entworfen. Dabei kann zwischen der nekrotrophen, biotrophen und hemibiotrophen Ernährungsform unterschieden werden. Nekrotrophe Pilze, wie zum Beispiel der Erreger der Maisbleiche *Cochliobolus heterostrophus* oder der Verursacher der Grauschimmelfäule *Botrytis cinerea*, töten das befallene Wirtsgewebe durch Sekretion von toxischen Molekülen oder lytischen Enzymen und ernähren sich von dem abgestorbenen organischen Material (Friesen *et al.*, 2008, Horbach *et al.*, 2011, Mendgen & Hahn, 2002, van Kan, 2006). Biotrophe Pilze hingegen sind auf lebendes pflanzliches Gewebe angewiesen, um ihren Lebenszyklus vollenden und um sich ernähren zu können. Daher ist es für Pathogene besonders wichtig das pflanzliche Immunsystem erfolgreich zu unterdrücken und den pflanzlichen Stoffwechsel zu dessen Gunsten umzuprogrammieren (Dodds & Rathjen, 2010, Doehlemann & Hemetsberger, 2013, Jones & Dangl, 2006, Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). Um den Wirt bestmöglich zu besiedeln, haben biotrophe Pilze ein weites Spektrum an Infektionsstrukturen entwickelt. Extrazelluläre Pathogene wie zum Beispiel *Cladosporium fulvum* besiedeln den apoplastischen Zwischenraum, Brandpilze wie *Ustilago maydis* hingegen verursachen eine Einstülpung der Plasmamembran, um eine biotrophe Interaktionszone mit dem Wirt zu etablieren (Brefort *et al.*, 2009, Joosten & de Wit, 1999). Andere Phytopathogene wie Rostpilze formen Haustorien, komplexe Interaktionsstrukturen, welche der Nährstoffaufnahme dienen (Hahn & Mendgen, 2001).

Eine hemibiotrophe Infektionsstrategie zeigen die pflanzenpathogenen Pilze *Colletotrichum lindemuthianum* und *Magnaporthe oryzaea*. Dies zeichnet sich durch eine biotrophe Lebensform zu Beginn der Interaktion aus, welche zu

einem späteren Zeitpunkt in eine nekrotrophe übergeht (Mendgen & Hahn, 2002).

1.2 *Ustilago maydis* - Der Erreger des Maisbeulenbrands

Ustilago maydis ist ein fakultativ biotrophes Phytopathogen und der Erreger des weltweit verbreiteten Maisbeulenbrands. Er wird der Klasse der Ustilaginomycetes, Ordnung Ustilaginales und Familie Ustilaginaceae (Brandpilze) zugeordnet. Brandpilze haben ein sehr enges Wirtsspektrum und befallen in erster Linie Süßgräser. Da sich darunter wichtige Nutzpflanzen wie Mais, Hirse, Zuckerrohr, Weizen und Gerste befinden, führt dies zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden (Begerow *et al.*, 2006, Brefort *et al.*, 2009, Kahmann *et al.*, 2000, Martinez-Espinoza *et al.*, 2002). *U. maydis* infiziert lediglich Mais (*Zea mays*) sowie dessen mutmaßliche Urform Teosinte (*Zea mays* ssp. *Mexicana* und ssp. *pavigluminis*) (Christensen, 1963, Doebley, 1992). Befallene Pflanzen zeigen Krankheitssymptome an allen oberirdischen Pflanzenteilen, die von leichten Chlorosen mit einhergehender Anthocyanbildung bis hin zu großen tumorartige Wucherungen reichen (Abb. 1) (Brefort *et al.*, 2009, Kahmann *et al.*, 2000). Innerhalb der gebildeten Tumore reifen schwarz pigmentierte Teliosporen heran, die beim Aufplatzen der Tumore freigesetzt werden und der Pflanze ein verbranntes Aussehen verleihen. Die Namensgebung des Pilzes ist auf diese Beobachtung zurückzuführen und leitet sich von dem lateinisch Verb *ustilare* (= verbrennen) ab. In den meisten Teilen der Welt gelten *U. maydis* Infektionen als schädliche Pflanzenerkrankung. In Mittel- und Südamerika dagegen werden die durch den Befall erzeugten Pflanzentumore jedoch als Delikatesse unter dem Namen „Huitlacoche“ zum Verzehr angeboten (Valverde *et al.*, 1995).

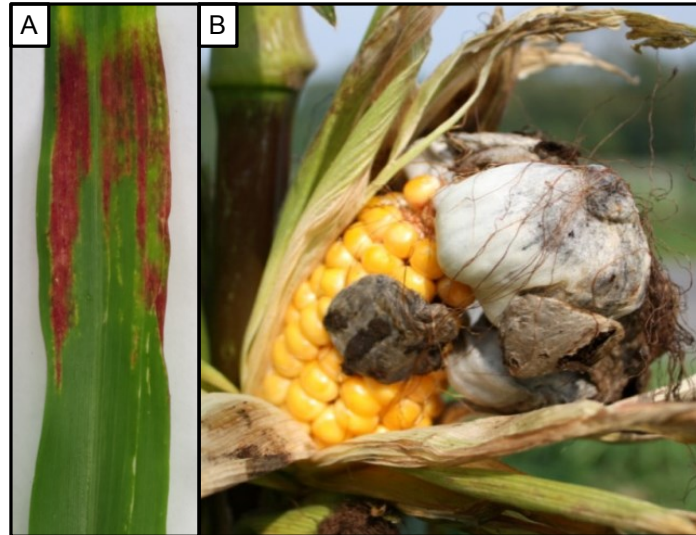


Abbildung 1: Krankheitssymptome von *U. maydis* infizierten Pflanzen

Infizierte Maispflanzen zeigen Krankheitssymptome an allen oberirdischen Pflanzenteilen, die von leichten Chlorosen mit einhergehender Anthocyanbildung (A), bis hin zu großen tumorartigen Wucherungen reichen (B). Foto B: R. Rösser

Innerhalb der letzten Jahre hat sich *U. maydis* zu einem wichtigen Modellorganismus für genetische und zellbiologische Fragestellungen, sowie für Untersuchungen biotropher Phytopathogene entwickelt. Dies hat mehrere Gründe: *U. maydis* besitzt einen biphasischen Lebenszyklus mit einer saprophytischen und einer obligat biotrophen Phase (Kahmann *et al.*, 2000). Die sogenannten Sporidien (saprophytisches Stadium) können leicht unter axenischen Bedingungen kultiviert werden. Zudem ist der komplette Lebenszyklus auf der Pflanze im Gewächshaus innerhalb von drei Wochen nachvollziehbar. Dies macht *U. maydis* zu einem geeigneten Modellorganismus für phytopathologische Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen. Darüber hinaus eignet sich *U. maydis* auch ideal für genetische Studien, da durch homologe Rekombination die DNA modifiziert werden kann (Banuett, 1995, Holliday, 1961, Holliday, 1964, Holliday, 2004). Es existieren konstitutive und induzierbare Promotoren, sowie integrative und selbstreplizierende Plasmide, die eine genetische Manipulation der Sporidien möglich machen (Brachmann *et al.*, 2001, Tsukuda *et al.*, 1988, Zarnack *et al.*, 2006). Die Entschlüsselung des 20,5 Mbp Genoms, sowie die Verfügbarkeit von Transkriptionsanalysen durch DNA-Mikroarrays, machen *U. maydis* in der molekularen Phytopathologie zu einem interessanten Modellorganismus (Basse & Steinberg, 2004, Bölker, 2001, Brefort *et al.*, 2009, Djamei & Kahmann, 2012,

Eichhorn *et al.*, 2006, Kahmann *et al.*, 2000, Kämper *et al.*, 2006).

Wie bereits erwähnt besitzt *U. maydis* einen biphasischen Lebenszyklus, bestehend aus einer saprophytischen (Abb. 2 A-C) und biotrophen (Abb. 2 D-H) Wachstumsphase. Zur Vollendung seines Lebenszyklus ist *U. maydis* auf seine Wirtspflanze Mais angewiesen. Der Pilz kann sich zwar saprophytisch als einzellige haploide Sporidie durch Knospung vermehren, für die sexuelle Fortpflanzung ist jedoch die Pflanze notwendig. Unter optimalen Bedingungen beträgt die asexuelle Verdopplungszeit von Sporidien ca. 2 Stunden. Im Falle der sexuellen Vermehrung erkennen sich Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps über ein Pheromon-Rezeptor-System auf der Blattoberfläche (Abb. 2 A). Die Pheromonperzeption führt zur Bildung unseptierter Konjugationshyphen, die entlang eines Pheromongradienten polar aufeinander zu wachsen und an ihren apikalen Spitzen fusionieren (Abb. 2 B) (Snetselaar *et al.*, 1996, Snetselaar & Mims, 1993). Das anschließend gebildete dikaryotische Filament (Abb. 2 C) wächst nach der Zellfusion auf der Cuticula der Pflanze weiter und zeichnet sich durch Spitzenwachstum aus. Durch die hydrophobe Pflanzenoberfläche und die Anwesenheit bestimmter Fettsäuren wird nach ca. 14 bis 16 Stunden das polare Wachstum eingestellt und es kommt zur Ausbildung eines Appressoriums (Abb. 2 D). Diese leicht geschwollene Struktur ermöglicht die Penetration des pflanzlichen Gewebes. Sekretierte lytische Enzyme bauen die Zellwand ab und ermöglichen das Eindringen einer invasiven Hyphe (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009, Schirawski *et al.*, 2005, Snetselaar & Mims, 1992). Dabei bleibt die pflanzliche Cytoplasmamembran intakt und ummantelt die penetrierende Hyphe eng. Auf diese Weise entsteht eine sogenannte apoplastische Interaktionszone, die dem Signalaustausch und dem Pilz die Aufnahme von Nährstoffen ermöglicht (Abb. 2 E) (Doehlemann *et al.*, 2009, Doehlemann *et al.*, 2008, Snetselaar & Mims, 1993). Als biotrophes Pflanzenpathogen sekretiert *U. maydis* Effektoren in diese Interaktionszone, um die basale Pflanzenabwehr zu unterdrücken und den pflanzlichen Metabolismus zu seinen Gunsten zu manipulieren (Djamei *et al.*, 2011, Doehlemann *et al.*, 2011, Doehlemann *et al.*, 2009). Ist die biotrophe Interaktion erfolgreich hergestellt, beginnt der Pilz die Epidermis, das Mesophyll sowie das vaskuläre Gewebe intra- und interzellulär zu kolonisieren (Abb. 2 F) (Banuett & Herskowitz, 1996). Fünf bis sechs Tage nach der Infektion ist eine massive

Proliferation der Hyphen im apoplastischen Zwischenraum zu beobachten und es kommt zur Anlagerung von großen pilzlichen Aggregaten (Abb. 2 G). Zu diesem Zeitpunkt sind zudem schon frühe Stadien der Tumorentwicklung auf der Pflanzenoberfläche erkennbar (Banuett & Herskowitz, 1994, Doehlemann *et al.*, 2008). Innerhalb der Tumore entwickelt der Brandpilz spezielle Sporen, die stark melanisierten diploiden Teliosporen (Banuett & Herskowitz, 1996, Snetselaar & Mims, 1993, Snetselaar & Mims, 1994). Durch Aufplatzen der Tumore werden diese freigesetzt und durch Regen, Wind oder Insekten verstreut, wobei sie über Jahre hinweg ihre Keimfähigkeit behalten. Unter günstigen Bedingungen (milde Temperaturen, hohe Umgebungsfeuchte) keimen die Sporen aus und bilden Probasidien, in denen die Meiose stattfindet (Abb. 2 H). Daraufhin entstehen Basidiosporen (haploide Sporidien), die sukzessiv abgeschnürt werden und somit kann der Lebenszyklus von Neuem beginnen (Abb. 2 A) (Christensen, 1963).

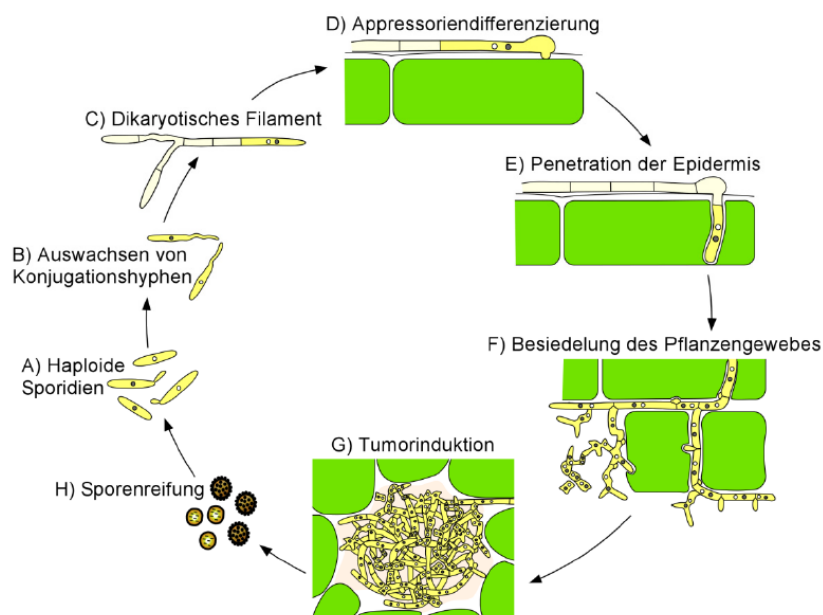


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*

Der biphasische Lebenszyklus von *U. maydis* besteht aus einer saprophytischen (A-C) und einer biotrophen Wachstumsphase (D-H). Während der saprophytischen Phase vermehrt sich *U. maydis* asexuell durch Knospung (A). Im Falle der sexuellen Fortpflanzung erkennen sich haploide Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps auf der Blattoberfläche. Es kommt zur Bildung von Konjugationshyphen die aufeinander zuwachsen und an den apikalen Spitzen fusionieren (B). Nach Fusion der kompatiblen Sporidien bildet sich ein dikaryotisches Filament (C). Die dikaryotische Hyphe formt ein Appressorium (D) und es kommt zur Penetration der pflanzlichen Epidermis (E). Der Pilz beginnt nun das pflanzliche Gewebe intra- und interzellulär zu kolonisieren (F), die Wirtszelle wird dabei jedoch nicht beschädigt. Es folgt eine massive Proliferation der Pilzhypen im apoplastischen Zwischenraum, was äußerlich durch die Bildung von Pflanzentumoren zu erkennen ist (G). Innerhalb der Tumore entwickeln sich diploide Teliosporen, welche durch aufplatzen der Tumore freigesetzt werden (H). Unter günstigen Bedingungen keimen diese aus, durchlaufen die Meiose und es entstehen haploide Sporidien (A) (Abbildung modifiziert nach Doehlemann *et al.*, 2008 und Kämper *et al.*, 2006).

1.2.1 Sekretierte *U. maydis* Effektoren

Biotrophe Pflanzenpathogene wie *U. maydis* sind auf die Sekretion von Effektorproteinen in die biotrophe Interaktionszone angewiesen, um die pflanzliche Immunabwehr zu unterdrücken und um den pflanzlichen Stoffwechsel zu ihren Gunsten umzuprogrammieren. Nur so kommt es zu einer erfolgreichen biotrophen Interaktion und das Pathogen kann seinen Wirt kolonisieren (Doehlemann *et al.*, 2008, Kämper *et al.*, 2006, Spanu *et al.*, 2010, Thomma *et al.*, 2005). Durch *in silico* Analysen konnten nach der Entschlüsselung des Genoms von *U. maydis* 554 potenziell sekretierte Proteine identifiziert werden, von denen 168 Proteine für mögliche Enzyme codieren. Für die restlichen 386 Proteine konnte keine Funktionsvorhersage getroffen werden, da eine Vielzahl dieser Proteine *U. maydis*-spezifisch sind (Mueller *et al.*, 2008). Interessanterweise ist ein Großteil der potenziell sekretierten Proteine in 12 Genclustern organisiert, die zwischen drei und 26 Gene enthalten. Mikroarray-basierte Expressionsanalysen zeigten, dass die meisten dieser Cluster spezifisch in Tumorgewebe transkriptionell hochreguliert sind, was auf eine mögliche Funktion während der pathogenen Entwicklung hindeutet. Einzeldelationen dieser Gencluster zeigten bei Infektion von Maiskeimlingen in fünf Fällen eine deutlich veränderte Virulenz. Diese reichte von Hypervirulenz bis hin zur Apathogenität (Kämper *et al.*, 2006). Durch mikroskopische Analysen konnte herausgefunden werden, dass die Mutanten Defekte in unterschiedlichen Infektionsphasen zeigen. Daher wird von verschiedenen zellulären Zielen der potenziellen Effektorproteine ausgegangen (Brefort *et al.*, 2009).

Das größte Gencluster 19A, welches für 24 sekretierte Effektoren codiert, konnte bereits funktionell charakterisiert werden. Die Deletion des gesamten Clusters offenbarte, dass die *U. maydis*-Mutante $\Delta 19A$ in der Lage ist die Pflanze zu besiedeln und den Lebenszyklus zu vollenden. Die Tumorbildung sowie die pilzliche Biomasse sind jedoch signifikant reduziert (Brefort *et al.*, 2014). Für einen Effektor dieses Clusters (Tin2 = *tumor induced protein 2*) konnte eine direkte Verbindung zu der Anthocyanin-Induktion in infiziertem Pflanzengewebe gezeigt werden. Tin2 interagiert mit der Proteinkinase ZmTTK1 innerhalb der Maiszellen, indem es ein Ubiquitin-Proteasom

Degradierungsmotiv markiert und somit die Kinaseaktivität stabilisiert. Die aktive Proteinkinase ZmTKK1 kontrolliert die Anthocyanin-Biosynthese. In Abwesenheit von Tin2 ist eine erhöhte Lignin- Biosynthese in infiziertem Gewebe zu beobachten. *U. maydis* induziert demnach gezielt die Anthocyanin-Biosynthese, um die Lignifizierung zu hemmen und Zugang zu den Gefäßbündeln zu erhalten (Tanaka *et al.*, 2014). Neben den von Kämper *et al.*, 2006 beschriebenen Genclustern, konnte noch ein weiteres Cluster identifiziert werden, welches ebenfalls eine wichtige Rolle für die Pathogenität spielt (Doehlemann *et al.*, 2011). Dies enthält vier sogenannte *pit-* (*protein important for tumors*) Gene (*pit1-4*). Außer *pit3* werden alle ausschließlich während der Wirtsbesiedlung exprimiert. *pit1* codiert für ein Membranprotein, *pit2* und *pit4* für potenziell sekretierte Effektoren während *pit3* Homologie zu einem Tubulin-spezifischen Chaperon aus Säugetieren zeigt. Die Deletion des kompletten Genclusters, sowie die Einzeldelation von *pit1* und *pit2* führen zu einem starken Virulenzverlust von *U. maydis* (Doehlemann *et al.*, 2011). Für den Effektor Pit2 konnte bereits nachgewiesen werden, dass dieser durch eine inhibierende Funktion auf apoplastische Cysteinproteasen, deren Aktivität direkt mit der durch Salizylsäure vermittelten Pflanzenabwehr in Verbindung steht, in der Lage ist die pflanzliche Immunantwort zu unterdrücken (Mueller *et al.*, 2013). Das sekretierte *U. maydis* Protein Pep1 (*protein essential during penetration 1*) ist ein Beispiel für einen Effektor, der nicht in einem Virulenzcluster lokalisiert ist. Die *U. maydis*-Deletionsmutante $\Delta pep1$ wird direkt zu Beginn der epidermalen Penetration von dem pflanzlichen Immunsystem gestoppt. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass Pep1 mit der pflanzlichen Peroxidase (POX12) interagiert, indem es deren Peroxidaseaktivität inhibiert. Dadurch wird die peroxidase-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt und die basale Pflanzenabwehr unterdrückt (Hemetsberger *et al.*, 2012). Ein weiterer bereits charakterisierter Effektor in *U. maydis* ist die sekretierte Chorismatmutase Cmu1. Diese wird in das pflanzliche Cytoplasma aufgenommen, um dort mit der Salizylsäure (SA)-Synthese zu interferieren. Dies geschieht indem Cmu1 aktiv in den Shikimatweg eingreift und dadurch die Umwandlung von Chorismat zu Phrephenat katalysiert. Die Folge dessen ist ein negativer Effekt auf die SA-abhängige Pflanzenabwehr, da für die SA-Synthese weniger Chorismat zu Verfügung steht. Darüber hinaus ist Cmu1 in der Lage

sich in benachbarten Pflanzenzellen auszubreiten und auch dort die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken (Djamei *et al.*, 2011).

1.2.2 Organspezifität von sekretierten *U. maydis* Effektoren

Die Fähigkeit von *U. maydis* alle oberirdischen Organe seiner Wirtspflanze *Zea mays* zu infizieren, lässt auf eine sehr flexible Kolonisierungsstrategie schließen, da diese Organe sich physiologisch, sowie strukturell voneinander unterscheiden. *U. maydis* muss demnach in der Lage sein, sich während seines Infektionsprozesses auf organspezifische Bedingungen einzustellen. Diese Annahme wird durch eine organspezifische Transkriptomanalyse, die parallel mit *U. maydis* und *Z. mays* Genen durchgeführt wurde, gestärkt. Sie zeigt deutliche Unterschiede in der Genexpression von Keimlingsblättern, adulten Blättern und männlichen Blütenständen, die zuvor mit *U. maydis* infiziert wurden. Drei Tage nach der Infektion konnte für ca. 4300 der insgesamt 6700 *U. maydis*-Gene eine Expression detektiert werden. Es wurden jedoch nur 1353 Gene in allen getesteten Organen exprimiert. Dies bedeutet, dass ca. 36% der *U. maydis*-Gene, drei Tage nach der Infektion, organspezifisch exprimiert werden (Abb. 3 A). Mit Fokus auf die *U. maydis*-Gene, die für potenziell sekretierte Proteine codieren, sind sogar 45% zu diesem Zeitpunkt organspezifisch exprimiert (Abb. 3 B) (Skibbe *et al.*, 2010). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine Gendeletion in *U. maydis*, welche zu keiner reduzierten Virulenz bei Keimlingsinfektion führt, durchaus eine wichtige Rolle in der pathogenen Entwicklung an einem anderen Organ spielen kann.

Um die organspezifische Rolle sekretierter *U. maydis*-Proteine funktionell zu untersuchen, wurden Keimlingsblätter, adulte Blätter sowie männliche Blütenstände mit den bereits in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen 12 Genclustermutanten infiziert (Kämper *et al.*, 2006, Skibbe *et al.*, 2010). In fünf Fällen ($\Delta 2A$, $\Delta 5B$, $\Delta 9A$, $\Delta 10A$, $\Delta 19A$) konnten organspezifische Phänotypen festgestellt werden, welche von Hypervirulenz bis hin zu einer kompletten Apathogenität reichten (Skibbe *et al.*, 2010). Passend zu diesen Ergebnissen zeigten 39 der insgesamt 47 Gene, die in den fünf Clustern mit einem organspezifischen Phänotyp lokalisiert sind, ebenfalls ein organspezifisches Expressionsprofil (Skibbe *et al.*, 2010).

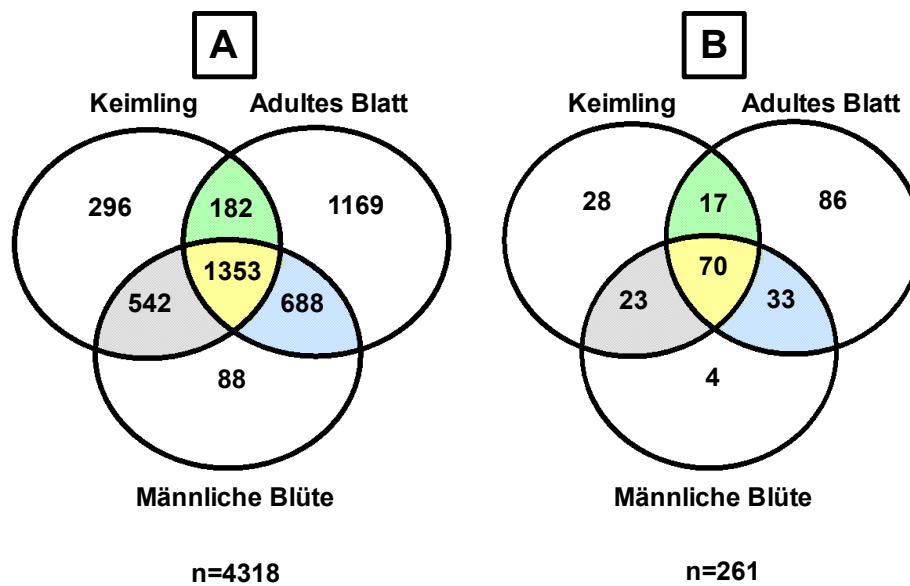


Abbildung 3: Expressionsprofil von *U. maydis*-Genen in unterschiedlichen Pflanzenorganen (Keimling, adultes Blatt, männliche Blüte), drei Tage nach der Infektion

Teil **A** der Abbildung zeigt das organspezifische Expressionsprofil von *U. maydis*-Genen, drei Tage nach der Infektion. Der Bereich **B** beinhaltet das Expressionsprofil der *U. maydis*-Gene, die für sekretierte Proteine codieren. Gene die nur in einem der getesteten Organe exprimiert werden, sind auf weißem Hintergrund dargestellt. Gene die in allen drei Organen exprimiert werden sind in gelb gekennzeichnet. Die grüne Region zeigt die Anzahl der Gene die in Keimlingen und adulten Blättern exprimiert sind. Der blaue Bereich stellt die Gene da, die in adulten Blättern und der männlichen Blüte exprimiert werden. In grau, sind die Gene die in der männlichen Blüte und im Keimling exprimiert sind, abgebildet. n=Anzahl der insgesamt detektierten Gene (Abbildung verändert nach Skibbe *et al.*, 2010).

1.3 Das pflanzliche Immunsystem

Pflanzen benötigen effektive Erkennungsmechanismen und eine effiziente Immunabwehr, um Angreifer frühzeitig wahrzunehmen und um entsprechend darauf zu reagieren. Im Gegensatz zu Säugetieren verfügen Pflanzen nicht über bewegliche Abwehrzellen und besitzen auch kein adaptives Immunsystem (Ausubel, 2005, Jones & Dangl, 2006). Nichtsdestotrotz sind Pflanzen in der Lage effektive Immunantworten zu entwickeln. Prinzipiell ist die pflanzliche Abwehr aus präformierten und induzierten Mechanismen aufgebaut. Als präformierte Abwehr gelten physikalische Barrieren, wie pflanzliche Zellwände und die wachsartige Cuticula, welche der Pflanze einen ersten Schutz gegen Pathogene und andere abiotische Umwelteinflüsse geben (Dangl & Jones, 2001, Hüchelhoven, 2007, Koeck *et al.*, 2011). Durch Vernetzung von Zellwandproteinen sowie durch Einlagerung von Callose, Suberin oder Lignin kann die präformierte Abwehr verstärkt werden (Perez-De-Luque *et al.*, 2007, Perez-De-Luque *et al.*, 2008).

Induzierte Mechanismen des pflanzlichen Immunsystems bestehen aus zwei Stufen. Die erste von der Pflanze aktiv eingeleitete Reaktion auf den Angriff eines Pathogens ist die durch die Erkennung von *microbe-/pathogen-associated molecular patterns* (MAMPs/PAMPs) induzierte Immunität (PTI = *pattern-triggered immunity*) (Abb. 4). Hierbei werden konservierte mikrobiologische Strukturen, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, Flaggelin, Chitin oder Ergosterol, durch spezielle pflanzliche Zellwandrezeptoren (PRRs = *pattern-recognition receptors*) erkannt (Chisholm *et al.*, 2006, Nürnberger *et al.*, 2004, Zipfel & Felix, 2005).

PRRs sind entweder rezeptorähnliche Kinasen (RLKs = *receptor-like kinases*) oder rezeptorähnliche Proteine (RLPs = *receptor-like proteins*). RLKs bestehen aus einer Ektodomäne, welche eventuell in die Ligandenbindung involviert ist, aus einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne. Charakteristisch für PRR-Ektodomänen sind Leucin-reiche Wiederholungen (LRRs = *leucin-rich repeats*), Lysin-/Lektin-Motive oder Domänen die epidermalen Wachstumsfaktoren ähneln (EGF = *epidermal growth factor*) (Brutus *et al.*, 2010, Chinchilla *et al.*, 2006, Jones & Dangl, 2006, Kaku *et al.*, 2006, Miya *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2013, Willmann *et al.*, 2011, Yamaguchi *et al.*, 2006). Die Erkennung molekularer Muster (MAMPs/PAMPs) durch PRRs führt zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges (MAP = *mitogen-activated protein*) und somit zu einer schnellen Induktion von Abwehrmechanismen wie Zellwandverstärkung durch Callosedeposition, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Expression einer Vielzahl von pflanzlichen Abwehrgenen (Chisholm *et al.*, 2006, Gomez-Gomez & Boller, 2000, Nürnberger *et al.*, 2004, Pieterse *et al.*, 2009, Zipfel *et al.*, 2006). Neben den exogenen MAMPs/PAMPs) können auch endogene Elicitoren, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), von PRRs erkannt werden und somit eine Abwehrreaktion auslösen. DAMPs werden durch Verletzung der Pflanze freigesetzt, wobei es unter anderem zu einem Abbau von Zuckerpolymeren kommt (Boller & Felix, 2009, Fry *et al.*, 1993, Lotze *et al.*, 2007, Ryan, 1987).

Um die PTI zu umgehen nutzen Pathogene Effektormoleküle (auch als Avr-Proteine = Aviruelnzproteine bezeichnet), die in das Pflanzengewebe sekretiert werden, um dort die MAMP/PAMP/DAMP induzierte Immunität zu unterdrücken

und für eine Effektor induzierte Suszeptibilität (ETS = *effector triggered susceptibility*) zu sorgen. Als Antwort darauf haben Pflanzen Resistenzproteine (R-Proteine) etabliert, welche pathogene Effektorproteine erkennen und somit zu einer Effektor induzierten Immunantwort (ETI = *effector-triggered immunity*), auch als R-Protein vermittelten Resistenz bezeichnet, führen (Abb. 4) (Jones & Dangl, 2006, Spoel & Dong, 2012). Die meisten Resistenzproteine verfügen über eine konservierte Nukleotidbindestelle (NB) und eine spezifische LRR-Domäne (*leucin-rich repeat* Domäne). Daher werden sie auch als NB-LRR-Proteine bezeichnet (Meyers *et al.*, 2003, Takken *et al.*, 2006). ETI ist eine erweiterte Version der PTI und oftmals mit der Aktivierung einer hypersensitiven Immunantwort (HR = *hypersensitive response*), also mit programmiertem Zelltod in dem befallenen Gewebe, verbunden (Abb. 4) (Espinosa & Alfano, 2004, Jones & Dangl, 2006, Kim *et al.*, 2005, Nomura *et al.*, 2005). Darüber hinaus kommt es zur Produktion von hydrolytischen Enzymen, wie Chitinasen und β -1,3-Glucanasen, wodurch die Pflanze eine lokale Resistenz gegen das Pathogen aufbaut (Chisholm *et al.*, 2006, Jones & Takemoto, 2004, Jones & Dangl, 2006, Nimchuk *et al.*, 2003, Spoel & Dong, 2012). Die Erkennung eines pathogenen Effektors durch ein pflanzliches R-Protein kann hierbei direkt oder indirekt stattfinden. Bei einer direkten Interaktion kontaktiert der Effektor direkt das R-Protein. Bisher konnten jedoch nur sehr wenige direkte Interaktionen belegt werden (Deslandes *et al.*, 2003, Dodds *et al.*, 2006, Jia *et al.*, 2000, Krasileva *et al.*, 2010, Ntoukakis *et al.*, 2014). Für Mechanismen, welche mit einer indirekten Interaktion in Verbindung stehen existieren mehrere Hypothesen. Eine davon ist die *Guard* (=Wächter) -Hypothese, die auf einer direkten Interaktion des Effektors mit einem „Hilfsprotein“ beruht. Dieses Hilfsprotein ist Teil eines R-Protein-Komplexes oder agiert als Co-Faktor und interagiert somit gleichzeitig mit dem Effektor sowie mit dem R-Protein (Collier & Moffett, 2009, van der Biezen & Jones, 1998). Darüber hinaus beschreibt die *Decoy* (=Köder) -Hypothese, dass Pflanzen im Laufe der Evolution die Zielproteine der pathogenen Effektoren duplizieren oder spezielle Köderproteine entwerfen, mit denen der Avirulenzfaktor interagiert und daraufhin abgebaut wird (van der Hoorn & Kamoun, 2008).

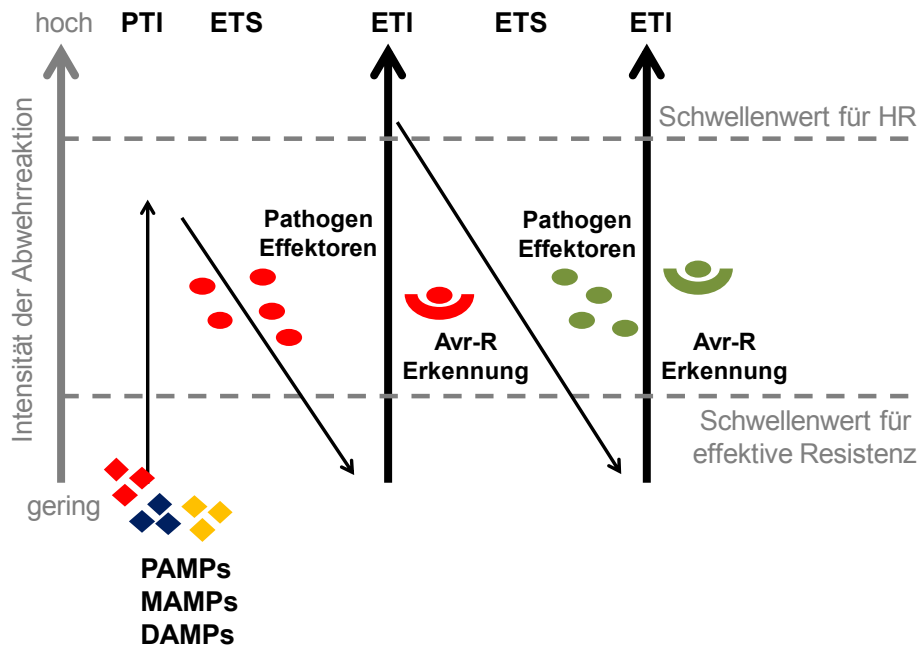


Abbildung 4: Grundlegende pflanzliche Abwehrreaktionen

Dieses vierphasige Modell verdeutlicht die Intensität der pflanzlichen Abwehrreaktionen nach Erkennung von pathogenen molekularen Mustern (PAMPs/MAMPs/DAMPs) oder Effektoren (Avr-Proteine). In der ersten Phase erkennen Pflanzen molekulare Strukturen wie PAMPs, MAMPs oder DAMPs durch spezielle Zellwandrezeptoren (PRRs) und induzieren die „*pattern-triggered immunity*“ (PTI). Phase zwei zeigt Sekretion eines Effektors (rot) durch das Pathogen, welcher mit der PTI interferiert und zu einer Effektor vermittelten Suszeptibilität (ETS) führt. Die dritte Phase beinhaltet die Erkennung eines pathogenen Effektors durch ein pflanzliches Resistenzprotein, was die Aktivierung der „*effector-triggered immunity*“ (ETI) zur Folge hat. Diese ist eine erweiterte Version der PTI und oftmals mit der Aktivierung einer hypersensitiven Immunantwort (HR) verbunden. In der vierten Phase interagiert ein neuer pathogener Effektor (grün) mit der ETI und führt aufs Neue zu einer ETS. Der Effektor wird durch spezifische Resistenzproteine erkannt und es kommt zur ETI (modifiziert nach Jones & Dangl, 2006).

1.4 Die pflanzliche Zellwand und die dort lokalisierten Arabinoxylane

Pflanzliche Zellwände sind hoch komplexe makromolekulare Strukturen, welche sich aus einer Vielzahl von Polysacchariden zusammensetzen. (O'Neill & York, 2003). Sie bestehen hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin (Abb. 5) (Hayashi, 1989, Tomme *et al.*, 1995). Grundsätzlich werden primäre und sekundäre pflanzliche Zellwände voneinander unterschieden. Primäre Zellwände werden nach Beendigung der Zellexpansion durch sekundäre Zellwände ersetzt. Bezüglich ihrer Zusammensetzung zeigen sekundäre Zellwände einen höheren Lignin- und Celluloseanteil verglichen mit primären Zellwänden. Zudem sind die Polysaccharide der sekundären Zellwand die keine Cellulose enthalten geringer vernetzt und besitzen weniger Seitenketten (Burton *et al.*, 2010).

Cellulose, ein unlösliches, kristallines Polymer, ist der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand und bildet den Kern der Mikrofibrillen (Hayashi, 1989).

Lignine sind Heteropolymere, die aus mehreren Phenylpropanmolekülen gebildet werden und der Zellwand in Verbindung mit Cellulose strukturelle Stärke verleihen. Darüber hinaus dienen sie als Abwehrfront bei einem Angriff eines Pathogens und bei oxidativem Stress (Perez *et al.*, 2002). Hemicellulosen wie zum Beispiel Xylane sind lösliche Heteropolymere, welche ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Strukturhaltung der Zellwand spielen (Hayashi, 1989). Das in erster Linie in der sekundären Zellwand vorkommende Xylan ist neben Cellulose das wichtigste Polysaccharid in der Pflanze (Ebringerová & Heinze, 2000). Zusammen mit Pektin bildet es die Matrix in der die kristallinen Cellulosefibrillen eingebettet vorliegen. Zudem bilden Xylane eine Barriere bei der Verzuckerung der Zellwand. Sie müssen zuerst abgebaut werden bevor die anderen Zellwandbestandteile verwertet werden können (Jeoh *et al.*, 2007).

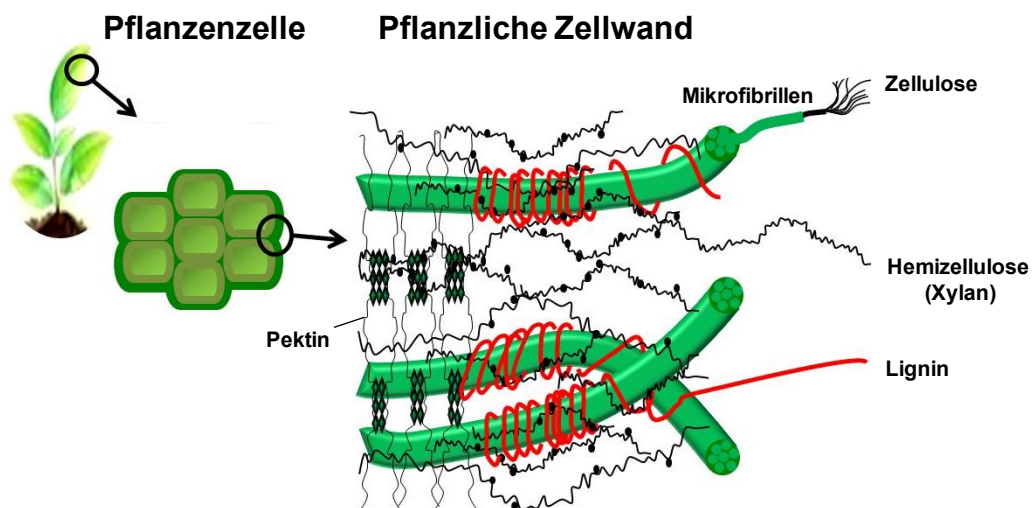


Abbildung 5: Aufbau der pflanzlichen Zellwand

Pflanzliche Zellwände sind hoch komplexe makromolekulare Strukturen, welche sich aus den miteinander interagierenden Polysacchariden Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin zusammensetzen (modifiziert nach Ratanakhanokchai *et al.*, 2013, Tomme *et al.*, 1995).

Mais (*Zea mays*) enthält ca. 13-25% Xylan (Trockengewicht) (Pordesimo *et al.*, 2005). Die chemische Struktur von Xylan besteht aus einem linearen Hauptgerüst, welches (1→4)-verknüpfte β -D-Xylopyranosyl-Reste (β -D-Xylp) beinhaltet. Von Getreide stammende Xylane tragen, neben der (1→2)-vernetzten α -D-Glucopyranosyl-Uronsäure oder deren 4-O Methylether (4-O-Me- α -D-GlcpA) und Acetylstsubstituenten vor allem (1→2)- und/oder (1→3)-verbundene α -L-Arabinofuranosyl-Reste (α -L-Araf) als Seitenketten (Abb. 6).

Daher werden sie auch als Arabinoxylane bezeichnet (Aspinall, 1980, Pastell *et al.*, 2009, Vazquez *et al.*, 2000). Ferular- und Cumarsäure können durch Esterbindungen mit den α -L-Arabinofuranosyl-Resten der Arabinoxylane vernetzt sein (Abb. 6) (Ishii, 1997). Der Gehalt und die strukturelle Anordnung von Seitenketten in Arabinoxylanen variiert zwischen unterschiedlichen Getreidespezies und ebenso zwischen den unterschiedlichen Organen der jeweiligen Pflanze (Aspinall, 1980, Pastell *et al.*, 2009, Vazquez *et al.*, 2000). Roggen-, Weizen-, Reis- und Haferkleie besitzen stark verzweigte Arabinoxylane, wohingegen schwach vernetzte Arabinoxylane in Reishülsen, Weizenstroh und Haferspелzen vorkommen (Hromadkova *et al.*, 1987, Puls *et al.*, 2006, Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999). Generell enthält die Zellwand des Endosperms in Getreide einen hohen Anteil an stark vernetzten Arabinoxylanen. Ausgesprochen lignifiziertes Gewebe, wie Gräser, Maiskolben oder Gerstenspelzen verfügen oftmals über weniger verzweigte Xylane mit 4-O-Me- α -D-GlcpA-Resten (Aspinall, 1980). Das Verhältnis von Arabinose zu Xylan liegt im Getreideendosperm ca. bei 1:2. Die Arabinose:Xylan Rate von Arabinoxylanen im Endosperm, der Aleuronschicht, des inneres Perikarps, der Samenschale und des äußeren Perikarps zeigt eine große Varianz. In vielen Getreiden verfügt jedoch das äußere Perikarp über die höchste Arabinose:Xylan Rate (Glitsko & Knudsen, 1999, Izydorczyk & Biliaderis, 1995, Ordaz-Ortiz & Saulnier, 2005). Manche Getreidexylane können auch Seitenketten enthalten die aus mehr als einem Zuckerrest bestehen (Aspinall, 1970). Ein Beispiel hierfür ist das Disaccharid D-Xylopyranosyl-L-Arabinofuranosyl, welches erstmals in Arabinoxylanen von Maiskolben und Gerstenspelzen nachgewiesen wurde (Aspinall, 1959, Aspinall & Ferrier, 1957, Whistler & Mcgilvray, 1955).

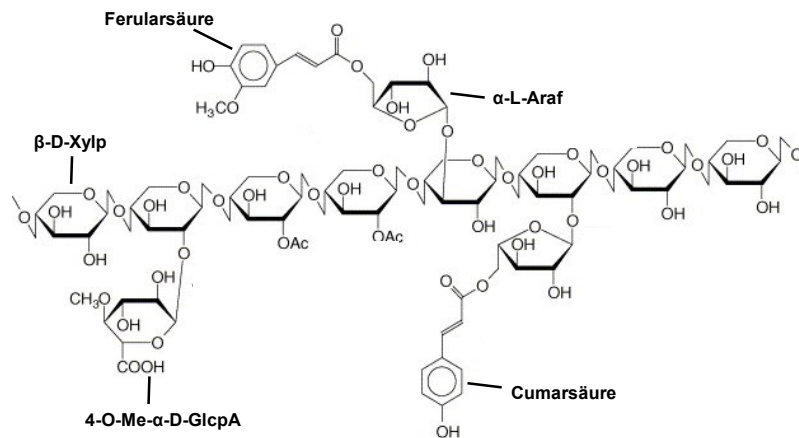


Abbildung 6: Die chemische Struktur von pflanzlichem Xylan

Strukturell betrachtet besteht Xylan aus einem linearen Hauptgerüst, welches $(1 \rightarrow 4)$ -verknüpfte β -D-Xylopyranosyl-Reste (β -D-Xylp) beinhaltet. Dieses Grundgerüst ist zusätzlich mit $(1 \rightarrow 2)$ - und/oder $(1 \rightarrow 3)$ -verbundenen α -L-Arabinofuranosyl-Resten (α -L-Araf) versehen, sowie mit $(1 \rightarrow 2)$ -vernetzter α -D-Glucopyranosyl-Uronsäure, oder deren 4-O Methylether (4-O-Me- α -D-GlcpA) und Acetylsubstituenten. Ferular- und Cumarsäure können durch Esterbindungen mit den α -L-Arabinofuranosyl-Resten vernetzt sein (modifiziert nach (Chavez et al., 2006)).

1.5 Die Rolle der Zellwand im pflanzlichen Immunsystem

Die pflanzliche Zellwand hat einen entscheidenden Einfluss auf das Zustandekommen einer Interaktion zwischen Pathogen und Wirt. Sie bildet zusammen mit der Cuticula eine erste physikalische Barriere die Pathogene passieren müssen, um anschließend das pflanzliche Gewebe zu kolonisieren (Bellincampi *et al.*, 2014, Dangl & Jones, 2001, Hüchelhoven, 2007, Koeck *et al.*, 2011).

Um diese präformierte Abwehr der Pflanze zu überwinden sekretieren nekrotrophe Pathogene eine diverse Vielzahl von zellwanddegradierenden Enzymen (CWDEs = *cell wall degrading enzymes*) (King *et al.*, 2011). Die Pflanze ist jedoch in der Lage die dadurch entstehende Beschädigung der Zellwand wahrzunehmen und durch Aktivierung von Abwehrmechanismen darauf zu reagieren. Im Falle von *Arabidopsis thaliana* wurde herausgefunden, dass der LRR-RLK-Rezeptor (*leucine-rich repeat receptor-like kinase*) ERECTA und ein heteromeres G-Protein in die Erkennung der Zellwandveränderung während eines Angriffes des nekrotrophen Schlauchpilzes *Plectosphaerella cucumerina* involviert sind, indem diese sehr wahrscheinlich die Intaktheit der Zellwand kontrollieren (Llorente *et al.*, 2005, Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2009) Zudem verfügt die Pflanze über CWDEs-Inhibitoren um die Beschädigung des

Zellwandpolymers zu minimieren. Ein Beispiel hierfür sind Polygalacturonase-Inhibitoren (PGIPs), welche die Aktivität von Oligogalacturonid (Bestandteil von Pektin) -degradierenden Polygalacturonasen (PGs) hemmen (Caprari *et al.*, 1993, D'Ovidio *et al.*, 2004). Eine Überexpression von PGIPs erhöht die pflanzliche Resistenz gegen nekrotrophe Pilze und Bakterien (Aguero *et al.*, 2005, Ferrari *et al.*, 2012). Die Folge einer Interaktion von PGIPs mit Polygalacturonasen ist eine Akkumulation der als Elicitor wirkenden Oligogalacturonide (OGs), welche in *A. thaliana* durch den Rezeptor WAK1 (*wall associated kinase 1*) wahrgenommen werden (Brutus *et al.*, 2010). Eine Überexpression der Polygalacturonase (PGII) von *Aspergillus niger* in *A. thaliana* und *Nicotiana tabacum*, veränderte die Pektin-Integration in der pflanzlichen Zellwand und führte zu einer konstitutiven Aktivierung der Abwehrgene, sowie zu einer Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* (Ferrari *et al.*, 2008). Um einer durch die Aktivität von Xylanasen entstehenden Xylanabbaugradierung entgegenzuwirken produzieren Pflanzen Xylanase-Inhibitoren (Bellincampi *et al.*, 2004, Juge, 2006). Bei konstitutiver Expression des Xylanase-Inhibitors TAXI-III in Weizen konnte eine reduzierte Anfälligkeit gegen *Fusarium graminearum*, Erreger der Ährenfusariose, beobachtet werden (Moscetti *et al.*, 2013). Xyloglucane sind wichtige Bestandteile der primären Zellwand, welche durch mikrobielle Xyloglucan-spezifische Endoglucanasen (XEGs) degradiert werden. XEGs von Pilzen werden durch Xyloglucan-Endoglucanase inhibierenden Proteine (XEGIPs) gehemmt. Diese XEGIPs konnten bereits in *Solanum lycopersicum*, *Daucus carota* und *Nicotiana tabacum* identifiziert werden (Juge, 2006).

Um die pflanzliche Zellwand zu durchbrechen sekretieren biotrophe und hemibiotrophe Pathogene eine wesentlich geringere Menge an CWDEs als nekrotrophe Pathogene, da sie während der Penetration der Zellwand ein Absterben der pflanzlichen Zelle verhindern müssen (Feng *et al.*, 2011, Zhao *et al.*, 2013). Viele biotrophe sowie hemibiotrophe Pilze bilden, spezielle Infektionsstrukturen, sogenannte Appressorien, die eine starke Adhäsion an die Pflanzenoberfläche vermitteln und Ausgangspunkt für die Bildung von Penetrationshyphen sind (Emmett & Parbery, 1975). Die Penetration der Zellwand erfolgt hierbei durch das Anlegen von mechanischem Druck (Wilson & Talbot, 2009).

Pflanzen reagieren neben der Produktion von CWDEs-Inhibitoren auf das Eindringen eines Pathogens, sowie auf Beschädigung der Zellwand, durch Papillenbildung. Dieser Abwehrmechanismus wird durch die Erkennung von MAMPs/PAMPs/DAMPs aktiviert und führt zu einer Verstärkung der Zellwand an der penetrierten Stelle. Papillen beinhalten neben Cellulose, Hemicellulose, Pectin, Lignin und Strukturproteinen wie zum Beispiel HRGPs (*hydroxyproline-rich glycoproteins*) hauptsächlich Callose (Aist, 1976, Celio *et al.*, 2004). Transgene *A. thaliana* Pflanzen, welche die Callosesynthase PMR4 überexprimierten, zeigten eine frühe und verstärkte Callosedeposition an der Penetrationsstelle und verhinderten somit die Bildung von Haustorien und das weitere Eindringen der biotrophen Pathogene *Golovinomyces cichoracearum* und *Blumeria graminis* (Ellinger *et al.*, 2013). In Papillen kommt es darüber hinaus zur Akkumulation von antimikrobiellen Peptiden, toxischen Sekundärmetaboliten sowie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche ebenfalls zur Resistenz beitragen (Bednarek *et al.*, 2009, Daudi *et al.*, 2012). Lignifizierung und Vernetzung von Proteinen in den Papillen macht diese widerstandsfähiger gegen den durch penetrierende Pathogene erzeugten mechanischen Druck, sowie gegen das Eindringen von Penetrationsstrukturen und verringert zudem die Verteilung von pathogenen Toxinen (Bechinger *et al.*, 1999, Bily *et al.*, 2003, O'Brien *et al.*, 2012, Sattler & Funnell-Harris, 2013).

1.6 α -L-Arabinofuranosidasen und deren Funktion als Virulenzfaktor

Um das Heteropolymer Xylan vollständig abbauen zu können, ist das Zusammenwirken mehrerer Enzyme, insbesondere Endo- β -Xylanasen und Arabinosidasen, notwendig (Crous *et al.*, 1996). Endo-1,4- β -Xylanases (EC 3.2.1.8) spalten die glycosidische Bindung der β -D-Xylopyranosyl-Reste im Xylan-Grundgerüst (Kubicek *et al.*, 2014). Arabinosidasen beinhalten α -L-Arabinosidasen (EC 3.2.1.55), Enzyme welche in der Lage sind endständige nichtreduzierende α -L-1,2-, α -L-1,3- und α -L-1,5- α -L-Arabinofuranosyl-Reste von α -L-Arabinofuranosiden, Arabinanen, Arabinoxylanen und Arabinogalactanen zu hydrolysieren (MargollesClark *et al.*, 1996). Sie werden anhand ihrer Aminosäuresequenz in vier Glucanaseklassen eingeteilt

(Glycosyl-Hydrolase-Familien (GH) 43, 51, 54 und 62). Glycosyl-Hydrolasen der Familie 51 und 54 zeigen besonders hohe Aktivität an arabinosehaltigen Polysacchariden (Chacón-Martínez *et al.*, 2004). Für Mitglieder der Familie 51 wurde bereits beschrieben, dass diese in der Lage sind β -D-Xylopyranosyl und α -L-Arabinofuranosyl *in vitro* von unterschiedlichen Substraten zu hydrolysieren. Diese Enzyme werden dann als bifunktionale Arabinofuranosidase/ β -D-Xylosidase bezeichnet (Xylosidase; EC3.2.1.37) (Chavez *et al.*, 2006).

Hemicellulose degradierende Enzyme wie zum Beispiel Xylanasen kommen auch in Phytopathogenen vor und wurden bereits bei einer Vielzahl isoliert (Walton, 1994). Aus diesem Grund ist die Identifizierung der Virulenzrelevanz dieser Enzyme im Bereich der Phytopathologie weit verbreitet. Bisher konnte jedoch die genaue Rolle von Xylan-degradierenden Enzymen für die Pathogenität noch nicht aufgeklärt werden (Chacón-Martínez *et al.*, 2004). Zum Beispiel identifizierten Yamjia *et al.*, 2009 eine α -L-Arabinofuranosidase/ β -Xylosidase als einen wichtigen Virulenzfaktor des nekrotrophen phytopathogenen Pilzes *Sclerotinia sclerotiorum* (Yajima *et al.*, 2009). Eine Arabinofuranosidase des Pilzes *Sclerotinia trifoliorum* zeigte ebenfalls Pathogenitätsrelevanz (Rehnstrom *et al.*, 1994). BcAra1 ist eine Endo-Arabinanase des nekrotrophen Pflanzenpathogens *Botrytis cinerea*. Dieses Enzym ist in der Lage Arabinane mit einer hohen Effizienz zu hydrolysieren und spielt eine relevante Rolle für die erfolgreiche Infektion von *Arabidopsis thaliana* (Nafisi *et al.*, 2014). Der Erreger der bakteriellen Blattbräune bei Reispflanzen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, sekretiert während der Proliferation in der Pflanze eine Xylanase (XynB), für die eine wichtige Virulenzfunktion nachgewiesen wurde (Rajeshwari *et al.*, 2005). 2014 konnten Santos *et al.* die Funktion dieser Xylanase aufklären. XynB trägt demnach dazu bei, die pflanzliche Zellwand zu durchbrechen, liefert Nährstoffe und erleichtert die Translokation von Effektormolekülen. Diesbezüglich arbeitet XynB mit XynA zusammen, eine Exooligoxylanase, welche wahrscheinlich die durch Oligosaccharide-induzierte Immunantwort unterdrückt (Santos *et al.*, 2014). Die Xylanase XynC des gram-negative Bakteriums *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Erreger der bakteriellen Fleckenkrankheit bei Paprika und Tomate, wird durch das Xps-System sekretiert und besitzt anschließend eine essentielle Funktion für die Pathogenität sowie für das bakterielle Wachstum in der Pflanze

(Szczesny *et al.*, 2010).

Im Gegensatz dazu konnte für Xylanasen der nekrotrophen Pilze *Trichoderma reesei* (Xylanase II) und *Trichoderma viride* (EIX) beobachtet werden, dass diese oder deren Abbauprodukte als molekulare Strukturen (MAMPs/DAMPs/DAMPs) von dem pflanzlichen Immunsystem wahrgenommen werden und somit Abwehrreaktionen aktivieren. Bei dem MAMP/PAMP-induzierten Immunitätsweg lösen zellwanddegradierende Enzyme, die Immunantwort unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität aus. Handelt es sich um eine DAMP-induzierte Immunantwort, wird diese durch die Produkte der enzymatischen Aktivität ausgelöst (Enkerli *et al.*, 1999, Fry *et al.*, 1993, Furman-Matarasso *et al.*, 1999, Ryan, 1987).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung organspezifischer *U. maydis* Effektoren. Zu Beginn der Arbeit lagen Mikroarraydaten einer organspezifischen Transkriptionsanalyse vor, die parallel mit *U. maydis* und *Z. mays* Genen durchgeführt wurde (Skibbe *et al.*, 2010). Basierend auf diesen Daten sollten Kandidatengene mit einem signifikant organspezifischen Expressionsprofil selektiert, sowie die Expression mittels quantitativer *real-time-PCR* bestätigt werden. Darauf aufbauend sollten Einzeldelentionsmutanten generiert werden, welche daraufhin durch Infektionsanalysen auf einen organspezifischen Virulenzdefekt getestet werden sollten. Mutanten mit einem interessanten Phänotyp sollten anschließend funktionell charakterisiert werden. Der Schwerpunkt lag diesbezüglich auf der funktionellen Charakterisierung des Gens *um01829*, mit Fokus auf die Lokalisierung und die Verifizierung der prognostizierten Funktion als α -L-Arabinofuranosidase.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung organspezifischer *U. maydis* Effektoren

In Zusammenarbeit mit meinen Mitdoktoranden Alexandra Matei und Amey Redkar erfolgte eine Selektion von Kandidatengenomen mit einem organspezifischen Expressionsprofil, unter Verwendung der bereits 2010 publizierten Daten der Transkriptionsanalyse von Skibbe *et al.* (vgl. Abschnitt 1.2.2).

Der Fokus lag hierbei darauf Gene zu finden, die für die *U. maydis* vermittelte Tumorinduktion in Maisblättern essentiell sind, jedoch für die Tumorbildung in der männlichen Maisblüte eine nebensächliche Rolle spielen, oder umgekehrt.

Demzufolge wurden Gene mit einer signifikant höheren Expression in infizierten Maisblättern, verglichen mit der Expression in den männlichen Blütenständen, als blattspezifische Kandidaten selektiert. Gene mit einer signifikant höheren Expression in männlichen Blütenständen, verglichen mit der Expression in Maisblättern, wurden als blütenspezifische Kandidaten ausgewählt. Anschließend sollte herausgefunden werden, welche dieser Kandidatengene für wenig konservierte Proteine codieren, wofür nach Orthologen in den nahverwandten Spezies *Sporisorium reilianum* und *Ustilago hordei* gesucht wurde (Tab. 1). Die Pilze *S. reilianum* und *U. hordei* verursachen lediglich Krankheitssymptome in der Infloreszenz und zeigen eine durchschnittliche Ähnlichkeit von 76% (*S. reilianum*, Schirawski *et al.*, 2010) bzw. 69% (*U. hordei*, Laurie *et al.*, 2012) zu *U. maydis* Proteinen. Dieses Auswahlkriterium basiert auf der Annahme, dass die Fähigkeit von *U. maydis*, Tumore in allen oberirdischen Organen der Pflanze zu erzeugen, auf der Codierung für Proteine mit neuartigen Funktionen und einer großen Divergenz beruht. 13 der blattspezifischen und zwei der blütenspezifischen Kandidaten zeigten eine Sequenzähnlichkeit von weniger als 50% zu ihren nächsten Verwandten *S. reilianum* oder *U. hordei* (Tab. 1). Für das blüteninduzierte Gen *um03046* konnten keinerlei Homologe in *S. reilianum* und *U. hordei* ermittelt werden. Es ist jedoch bereits bekannt, dass *um03046* von dem Transkriptionsfaktor Biz1 reguliert wird. Biz1 codiert für einen Cys2His2 Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, welcher in den G2-Zellzyklus-Arrest (der einer Pflanzenpenetration

vorgeschaltet ist), sowie in die Appressorieninduktion involviert ist (Bakkeren *et al.*, 2008, Flor-Parra *et al.*, 2006, Zahiri *et al.*, 2010)

Tabelle 1: Kandidatengene für organspezifische *U. maydis* Effektoren

*Die vorhergesagte Funktion der Kandidatengene wurde unter Anwendung der Software PEDANT (Helmholz-Zentrum, München) ermittelt. **Similarität zu Homologen der nahverwandten Spezies *S. reilianum* und *U. hordei*. ***Die Indizes zeigen die Intensität der Krankheitssymptome und sind in Relation zu SG200 dargestellt, welcher auf 1 gesetzt wurde. wt = Wildtyp.

Gene	Vorhergesagte Funktion*	Similarität <i>S. reilianum</i> (%)**	Similarität <i>U. hordei</i> (%)**	Virulenz Keimlingsblätter	Tumorformations-Index Keimlingsblätter***	Virulenz Männliche Blüte	Tumorformations-Index Männliche Blüte***
<i>um06222</i>	Uncharakterisiertes Protein	14	19	wt	1.05 ± 0.09	wt	0.99 ± 0.14
<i>um11763</i>	Esterase (Xylanase)	54	54	wt	0.92 ± 0.09	wt	1.03 ± 0.07
<i>um02239</i>	Uncharakterisiertes Protein	40	34	reduziert	0.65 ± 0.05	wt	1.03 ± 0.04
<i>um05223</i>	beta-1,6-Glucanase	67	64	wt	1.02 ± 0.35	wt	1.01 ± 0.08
<i>um06127</i>	Uncharakterisiertes Protein	14	26	wt	1.24 ± 0.32	wt	0.94 ± 0.05
<i>um01130</i>	Metallionen-Bindungsdomäne	62	58	wt	0.99 ± 0.02	wt	0.96 ± 0.04
<i>um06223</i>	Uncharakterisiertes Protein	13	15	reduziert	0.45 ± 0.11	reduziert	0.77 ± 0.04
<i>um05311</i>	Uncharakterisiertes Protein	22	23	reduziert	0.72 ± 0.15	wt	1.00 ± 0.05
<i>um01690</i>	Uncharakterisiertes Protein	45	46	reduziert	0.86 ± 0.02	wt	1.01 ± 0.04
<i>um01829</i>	alpha-L-Arabinofuranosidase	81	72	reduziert	0.69 ± 0.13	wt	1.03 ± 0.22
<i>um12313</i>	Uncharakterisiertes Protein	40	38	wt	0.89 ± 0.1	wt	0.95 ± 0.06
<i>um10553</i>	Uncharakterisiertes Protein	34	15	wt	0.95 ± 0.06	wt	0.97 ± 0.02
<i>um05318</i>	Uncharakterisiertes Protein	31	19	reduziert	0.75 ± 0.12	wt	0.98 ± 0.02
<i>um05306</i>	Uncharakterisiertes Protein	32	31	reduziert	0.76 ± 0.06	wt	1.04 ± 0.11
<i>um11060</i>	Uncharakterisiertes Protein	16	16	reduziert	0.72 ± 0.07	wt	0.98 ± 0.03
<i>um05495</i>	Endoglucanase	47	44	wt	0.93 ± 0.13	wt	0.97 ± 0.11
<i>um12217</i>	Uncharakterisiertes Protein	19	20	reduziert	0.83 ± 0.1	reduziert	0.80 ± 0.04
<i>um03046</i>	Uncharakterisiertes Protein	-	-	wt	0.88 ± 0.09	wt	0.95 ± 0.07
<i>um03650</i>	Uncharakterisiertes Protein	-	26	wt	1.08 ± 0.26	reduziert	0.64 ± 0.06
<i>um05439</i>	Chitin-bindendes Protein	63	63	wt	1.03 ± 0.09	reduziert	0.84 ± 0.09
<i>um00154</i>	Para-nitrobenzyl-Esterase	72	63	reduziert	0.74 ± 0.01	hyper-virulent	1.13 ± 0.03

In einem nächsten Schritt wurden die organspezifischen Expressionsprofile der ausgewählten Kandidaten per quantitativer *real-time-PCR* (*qRT-PCR*) bestätigt. Basierend auf den Ergebnissen der *qRT-PCR* konnten die Kandidatengene in drei Expressionsgruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 ist in Abbildung 7 in grün dargestellt und enthält die Kandidaten, die an beiden getesteten Zeitpunkten (3 und 9 Tage nach der Infektion) eine signifikant blattspezifische Expression zeigten. Die in hellgrün abgebildeten Mitglieder der Gruppe 2 wiesen an einem der getesteten Zeitpunkte eine signifikant blattspezifische Expression auf und Gruppe 3, in gelb, umfasst die Gene, die signifikant spezifisch in der männliche Blüte exprimiert wurden. Die vier blütenspezifischen Kandidaten (*um00154*, *um03046*, *um03650*, *um05439*) waren gerade neun Tage nach der Infektion sehr stark in den männlichen Blütenständen induziert, während nahezu keine Expression in den Maisblättern detektiert wurde (Abb. 7). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die *U. maydis* induzierte Tumorbildung in vollem Gange.

Interessanterweise liegen drei der blattspezifischen Kandidaten (*um05306*, *um05311* und *um05318*) in dem bereits in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen *U. maydis* Effektor-Cluster 19A (Kämper *et al.*, 2006). Die Deletionsmutante dieses Clusters, welches 24 vorhergesagte sekretierte Effektoren beinhaltet, zeigte bei infizierten Maispflanzen einen Defekt in der Tumorentwicklung an Maisblättern, jedoch nicht an den männlichen Blütenständen (Kämper *et al.*, 2006, Skibbe *et al.*, 2010). Kürzlich wurde in diesem Cluster eine kleine Genfamilie (Tin1-1 – Tin1-5) und vier individuelle Effektoren (Tin2, Tin3, Tin4, Tin5) gefunden, die für eine vollständige *U. maydis* Virulenz in Maisblättern essentiell sind (Brefort *et al.*, 2014). Das *U. maydis* Gen *um05318* codiert für den Effektor Tin4 und wurde somit in zwei voneinander unabhängigen Selektionsansätzen als Effektorgen identifiziert (Brefort *et al.*, 2014, Schilling *et al.*, 2014).

Zusammenfassend konnten mittels dieser Selektionskriterien 21 organspezifische *U. maydis* Effektoren entdeckt werden. Davon wurden 17 Kandidaten als blattspezifisch eingeordnet, da sie ausschließlich oder mindestens an einem der gewählten Zeitpunkte, signifikant höher bei Blattinfektionen im Vergleich zu Blüteninfektionen exprimiert waren. Darüber hinaus wurden vier der Kandidaten als blütenspezifisch eingeordnet, da sie eine deutlich höhere Expression bei Blüteninfektionen, im Vergleich zu Blattinfektionen, zeigten. Eines dieser Blütenspezifischen Gene (*um05439*)

konnte ausschließlich bei Blüteninfektionen detektiert werden (Abb. 7) (Schilling *et al.*, 2014).

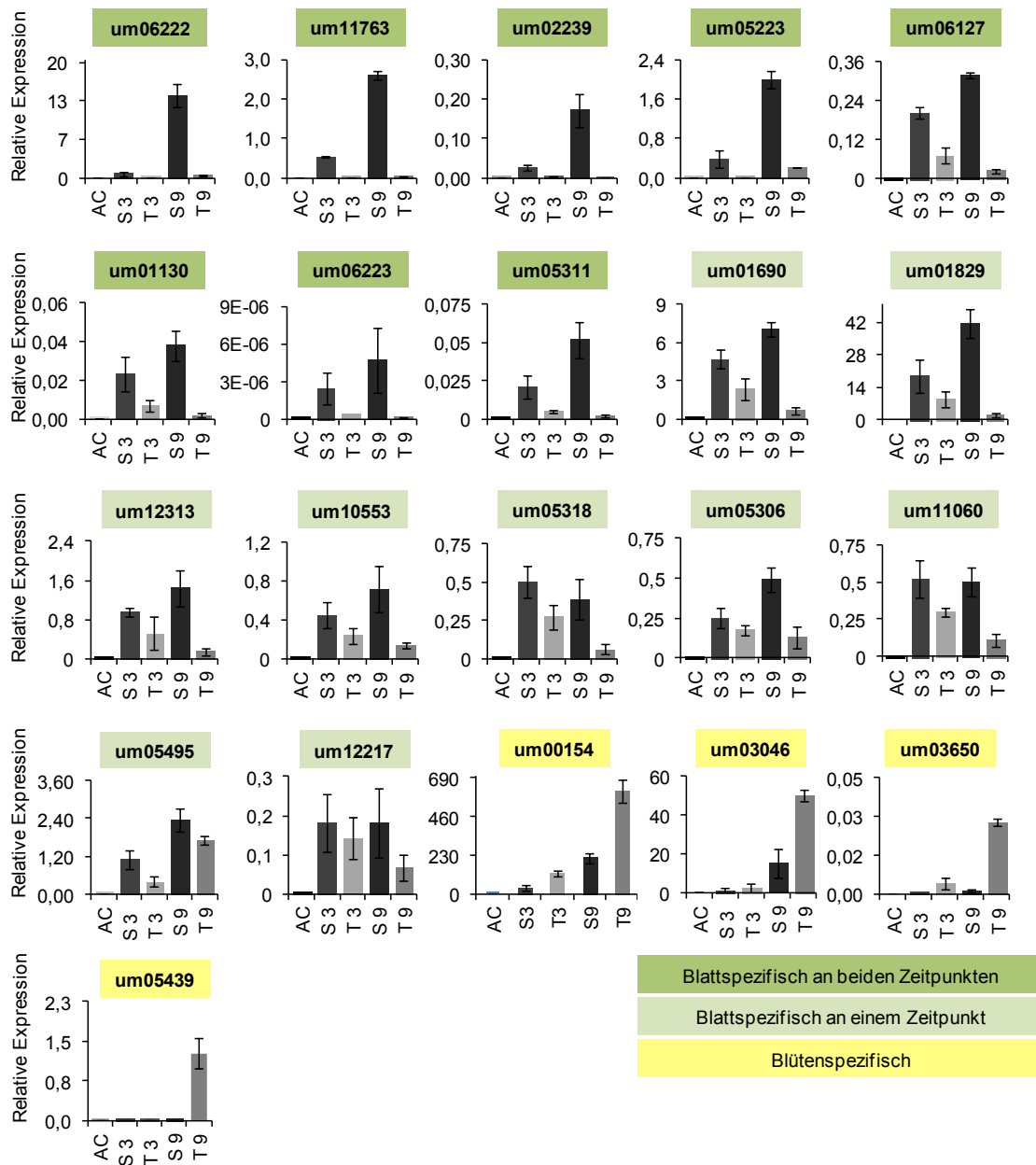


Abbildung 7: Expressionsprofil von organspezifischen *U. maydis* Effektorgenen

Die Expressionshöhe der einzelnen Kandidaten ist in Relation zu der Expression von der *U. maydis* Peptidylprolyl Isomerase (*ppi*) angegeben (Bohlmann, 1996). Die Genexpression wurde in axenischer Kultur (AC), Blättern 3 Tage nach der Infektion (S3), männlichen Blütenständen 3 Tage nach der Infektion (T3), Blättern 9 Tage nach der Infektion (S9) und männlichen Blütenständen 9 Tage nach der Infektion (T9), in drei biologischen Replikaten ermittelt. In grün hinterlegte Kandidaten zeigen eine blattspezifische Expression an beiden Zeitpunkten. Die Gene, die in hellgrün hinterlegt sind, zeigen nur an einem der gewählten Zeitpunkte eine blattspezifische Expression. Die in gelb markierten Kandidaten sind an beiden Zeitpunkten spezifisch in der männlichen Blüte exprimiert.

2.2 Charakterisierung organspezifischer *U. maydis* Effektoren

Für die funktionelle Analyse der selektierten Kandidatengene wurden in Zusammenarbeit mit Alexandra Matei und Amey Redkar zunächst Einzeldelationen in dem solopathogenen *U. maydis* Stamm SG200 erstellt (Kämper *et al.*, 2006). Die Deletionsmutanten der Gene *um03046* und *um05318* stellten freundlicherweise die Labore von Jörg Kämper (KIT Karlsruhe, Deutschland) bzw. von Regine Kahmann (MPI Marburg, Deutschland) für die Charakterisierung zur Verfügung. Um auszuschließen, dass die Deletion eines bestimmten Gens eine Auswirkung auf das saprophytische Wachstumsverhalten unter Stressbedingungen hat, wurde das Wachstum der generierten Deletionsmutanten auf unterschiedlichen Stressmedien im Vergleich zu dem Wildtyp SG200 untersucht. Die dem Medium zugesetzten Substanzen dienten der Überprüfung des filamentösen Wachstums (Charcoal) sowie der Induktion von osmotischem Stress (Sorbitol, NaCl), Zellwandstress (Calcofluor white (CW), Kongorot) und oxidativem Stress (H_2O_2) (Abb. 8). Die Deletion des Gens *um06223* hatte einen generellen Wachstumsdefekt zur Folge. Der Stamm zeigte ein deutlich reduziertes Wachstum, speziell auf Medium, welches mit den Zellwandstress induzierenden Chemikalien Kongorot und Calcofluor white (CW) versetzt wurde. Ebenso wies die Mutante eine reduzierte Filamentbildung auf Charcoal-haltigem Medium auf. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der anderen getesteten Mutanten mit dem Wildtyp (SG200) vergleichbar (Abb. 8).

In einem nächsten Schritt wurden Maisinfektionen mit allen erstellten Deletionsstämmen in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Pro Replikat erfolgten die Blattinfektionen bei 40 Pflanzen und im Falle von Blüteninfektionen bei 20 Pflanzen. Die Quantifizierung der Krankheitssymptome wurde für Blattinfektionen 12 Tage nach der Infektion, wie bereits von Kämper *et al.*, 2006 beschrieben, durchgeführt. Blüteninfektionen wurden 14 Tage nach der Infektion ausgewertet. Um die Krankheitssymptome der Blüteninfektionen quantitativ zu evaluieren, wurde von Amey Redkar eine neue Klassifizierung entwickelt. Demzufolge wurden die Symptome, in Abhängigkeit von ihrem Ausmaß, in fünf Kategorien eingeteilt. Die Klassifizierungskriterien beruhen

hierbei auf der in Tumore umgewandelten Fläche, der Tumorgroße und dem erreichten Entwicklungsstand der Blüte (Abb. 31).



Abbildung 8: Wachstum von generierten *U. maydis* Deletionsstämmen auf unterschiedlichen Nährböden

Verdünnungsreihen von exponentiell wachsenden Zellen des Stammes SG200, sowie der Einzeldelentionsmutanten der folgenden Gene: *um00154*, *um01690*, *um01829*, *um02239*, *um03650*, *um05406*, *um05311*, *um05318*, *um05439*, *um06223*, *um11060* und *um12217* wurden erstellt. Diese wurden anschließend auf CM-Glucose Platten versetzt mit Calcofluor white (CW) (100 µg/ml), Charcoal (0,01g/ml), Kongorot (45µg/ml), H₂O₂ (1mM), NaCl (1M) oder Sorbitol (1M), getropft. Die getesteten Substanzen dienen der Überprüfung des filamentösen Wachstums (Charcoal) sowie der Induktion von osmotischem Stress (Sorbitol, NaCl), Zellwandstress (Calcofluor white, Kongorot) und oxidativem Stress (H₂O₂). Die Inkubation der Platten betrug 2-4 Tage bei 28°C. Die Stresstest wurden in drei Replikaten durchgeführt. Die Abbildung zeigt repräsentative Beispiele.

Da alle identifizierten Phänotypen in dieser Arbeit quantitativ waren, also alle Mutanten partielle Einschränkungen in ihrer Virulenz zeigten, jedoch keine komplette Apathogenität, wurde anhand der ermittelten Infektionsdaten ein Tumorformations-Index berechnet. Die Auswertung des Index erfolgte statistisch mittels eines ungepaarten T-Tests. Anhand dieser Berechnung konnte eine signifikant reduzierte Virulenz, für neun der 17 blattspezifischen Deletionsmutanten beobachtet werden (Abb. 9, 10; Tab. 1).

Die Deletion der Gene *um06223* und *um12217* verursachte eine reduzierte Virulenz in beiden getesteten Organen und die Mutanten der Gene *um01690*, *um01829*, *um02239*, *um05306*, *um05311*, *um05318* sowie *um11060* zeigten eine blattspezifisch reduzierte Virulenz (Abb. 9; Tab. 1). Eine blütenspezifisch

reduzierte Virulenz war bei den Deletionsstämmen der blüteninduzierten Gene *um03650* und *um05439* zu beobachten (Abb. 9; Tab. 1). Der Phänotyp der Deletionsmutante des blütenspezifisch exprimierten Gens *um00154* reichte von einer reduzierten Virulenz, im Falle von Blattinfektionen, bis hin zu einer Hypervirulenz bei Infektionen der männlichen Blüte (Abb. 10; Tab. 1). Die Deletion des ebenfalls blüteninduzierten Gens *um3046* hatte in beiden getesteten Organen keinen ersichtlichen Virulenzdefekt zur Folge (Abb. 10; Tab. 1). Mutanten mit reduzierten Virulenzsymptomen an Blättern waren in der Lage Tumore zu bilden. Diese wiesen jedoch eine erheblich geringere Größe auf (2-4 mm Durchmesser), als es bei Infektionen mit dem Wildtyp (SG200) zu beobachten war (Abb. 11). Im Falle der blütenspezifischen Phänotypen verursachte die Deletion der Gene *um03650* und *um05439* ein signifikant verringertes Auftreten der Tumore an der Blüte und die Deletion von *um00154* führte zu einer signifikant erhöhten Tumorfrequenz. Die Stärke und Form der Tumore waren jedoch mit Wildtypinfektionen vergleichbar. Um zu bestätigen, dass die beobachteten Virulenzdefekte einzig auf der Deletion des jeweiligen Gens beruhen, erfolgte daraufhin eine genetische Komplementation der Stämme SG200 Δ *um00154*, SG200 Δ *um01690*, SG200 Δ *um01829*, SG200 Δ *um02239*, SG200 Δ *um03650*, SG200 Δ *um05306*, SG200 Δ *um05311*, SG200 Δ *um05318*, SG200 Δ *um05439*, SG200 Δ *um11060* und SG200 Δ *um12217*. Dafür wurde das jeweilige Gen inklusive 1kb der nativen Promotorregion in den ektopischen *ip* (*iron-sulphur protein*) -Lokus integriert. Die anschließenden Infektionstests mit den generierten Komplementationsstämmen zeigten in allen Fällen eine komplette Wiederherstellung der Virulenz des solopathogenen Stamms SG200 (Abb. 9). Ausnahme hierbei war *um00154*, siehe folgendes Kapitel.

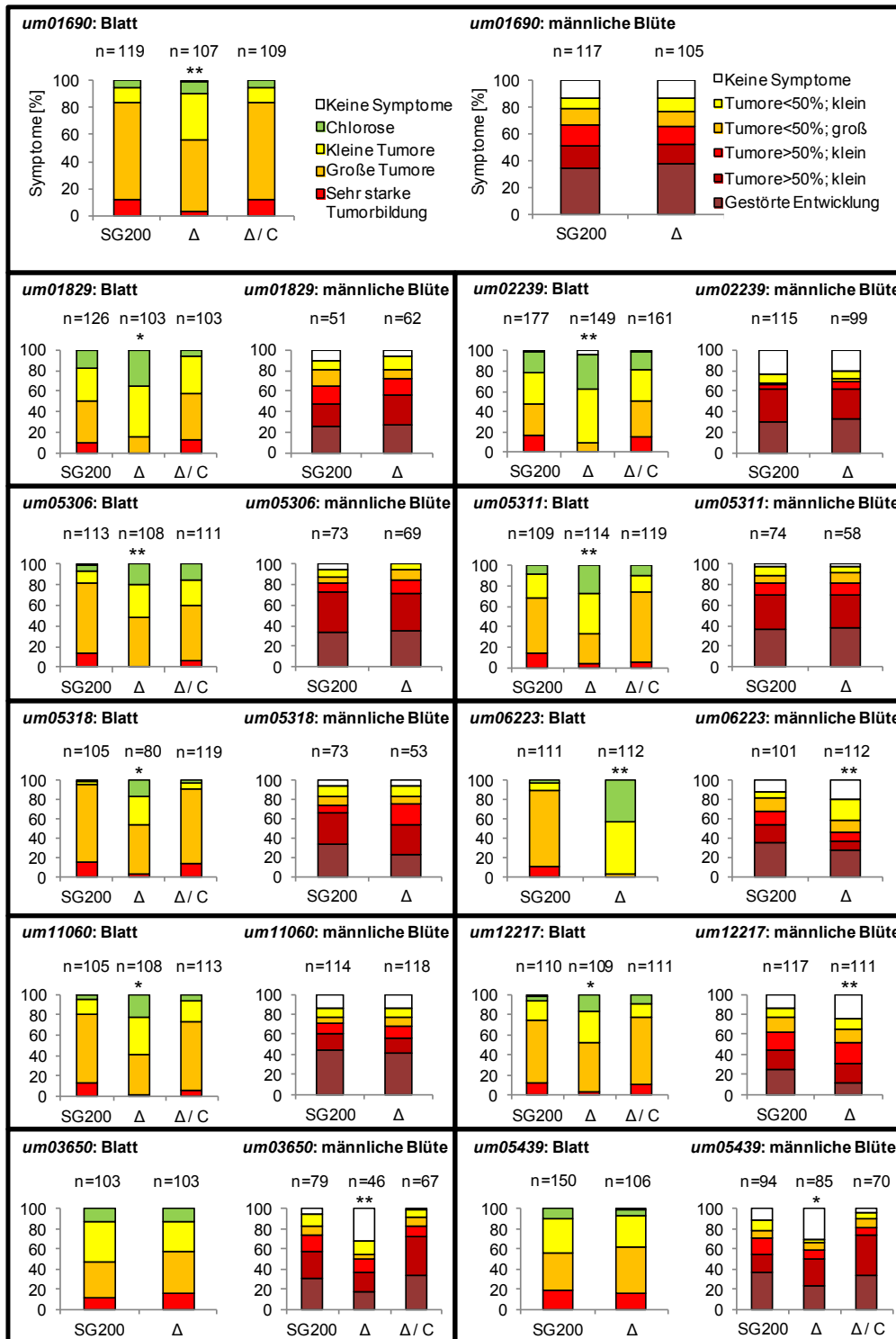


Abbildung 9: Krankheitssymptome der erstellten *U. maydis* Mutanten mit einer signifikant reduzierten Virulenz bei Blatt- und/oder Blüteninfektionen

Die Einteilung der Symptome an Maisblättern fand 12 Tage nach der Infektion statt, die der männlichen Blüte 14 Tage nach der Infektion. SG200: solopathogener Ausgangsstamm, Δ: Deletionsmutanten der selektierten organspezifischen Kandidatengene, Δ/C: Genetische Komplementation der Deletionsstämme. * bzw. ** markieren die *U. maydis* Stämme mit einem signifikant reduzierten Tumorformations-Index (die zugehörigen Werte sind in Tabelle 1 abgebildet). * = p ≤ 0.01; ** = p ≤ 0.001; n = Anzahl der infizierten Pflanzen. Alle Experimente wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

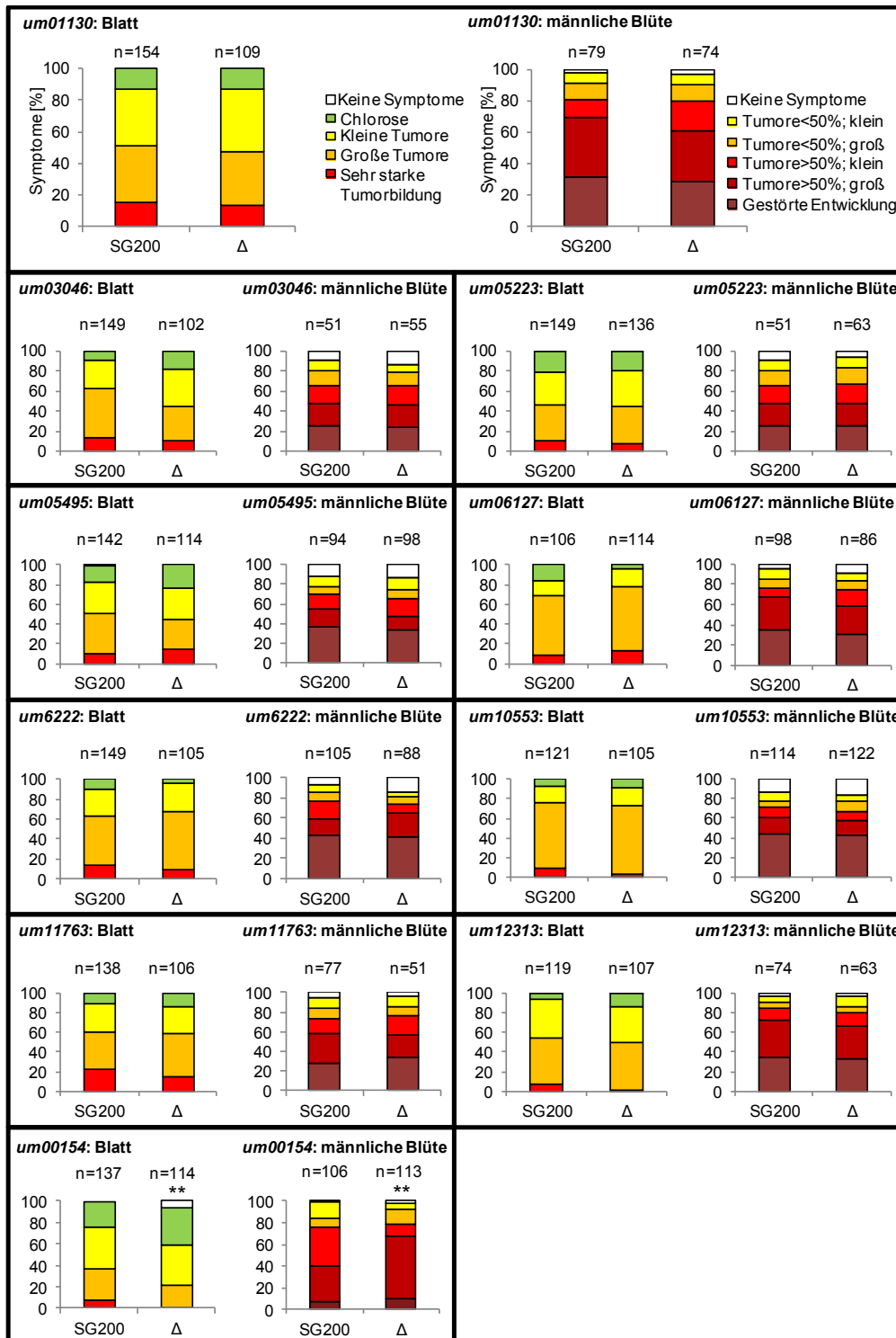


Abbildung 10: Krankheitssymptome der erstellten *U. maydis* Mutanten mit keiner signifikant reduzierten Virulenz bei Blatt- und/oder Blüteninfektionen.

Die Einteilung der Symptome an Maisblättern fand 12 Tage nach der Infektion statt, die der männlichen Blüte 14 Tage nach der Infektion. Der Phänotyp des Deletionsstamms SG200Δum00154 konnte nicht komplementiert werden, daher ist dieser Kandidat in dieser Abbildung gezeigt (vgl. Kapitel 2.3).

SG200: solopathogener Ausgangsstamm, Δ: Deletionsmutanten der selektierten organspezifischen Kandidatengene. * bzw. ** markieren die *U. maydis* Stämme mit einem signifikant reduzierten Tumorformations-Index (die zugehörigen Werte sind in Tabelle 1 abgebildet). * = $p \leq 0.01$; ** = $p \leq 0.001$; n = Anzahl der infizierten Pflanzen. Alle Experimente wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt.

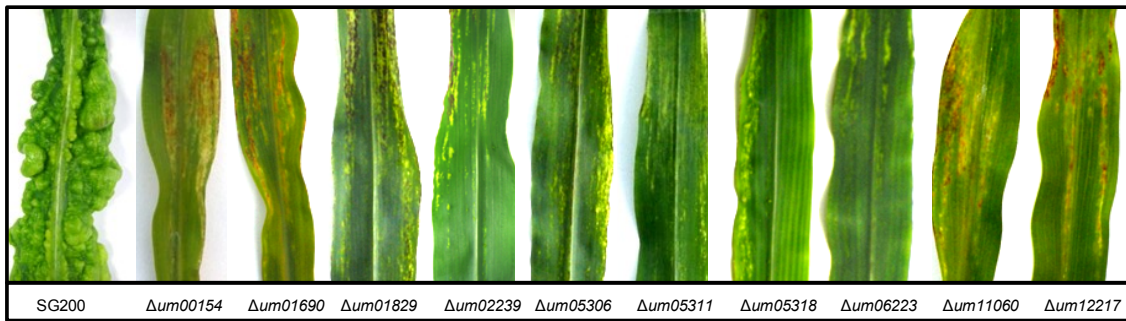


Abbildung 11: Krankheits-symptome der erstellten *U. maydis* Deletionsmutanten an Maisblättern
 Sieben Tage alte Maiskeimlinge wurden mit dem *U. maydis* Stamm SG200, sowie mit den Deletionsmutanten der Gene *um00154*, *um01690*, *um01829*, *um02239*, *um05306*, *um05311*, *um05318*, *um06223*, *um11060* und *um12217* infiziert. Die Abbildung zeigt typische Krankheits-symptome an Maisblättern 12 Tage nach der Infektion. Alle Mutanten verursachen Chlorosen und Anthocyanbildung, die mit denen des Wildtyps vergleichbar sind. Die Tumorbildung der infizierten Deletionsmutanten ist jedoch deutlich reduziert.

Zusammenfassend konnten mittels der hier durchgeführten Deletionsanalysen sieben blattspezifische Effektorgene, zwei blütenspezifische Effektoren und zwei Gene welche für die Virulenz in beiden Organen notwendig sind, identifiziert werden (Abb. 9; Tab. 1). Die anschließenden, detaillierteren Analysen der blattspezifischen Kandidaten *um02239* und *um01829* werden in den Abschnitten 2.4 (*um02239*) und 2.5 (*um01829*) dieser Arbeit beschrieben.

2.3 Der genetisch nicht komplementierbare *U. maydis* Deletionsstamm

SG200Δum00154

Das Gen *um00154* codiert für ein 75,5 kD Protein. Bioinformatische Analysen prognostizierten ein 22 Aminosäuren langes Signalpeptid im N-Terminus und eine Funktion als Para-nitrobenzyl-Esterase (PEDANT (Helmholz-Zentrum, München); SignalP 4.1). Wie bereits gezeigt wies der organspezifische Kandidat *um00154* bei Maisinfektionen ein organspezifisches Expressionsprofil auf (Abb. 7). Zudem war bei der Deletionsmutante SG200Δum00154 ein sehr interessanter organspezifischer Virulenzdefekt zu beobachten. Bei Blattinfektionen war eine reduzierte Virulenz im Vergleich zu Wildtypinfektionen und bei Infektionen der männlichen Blüte eine Hypervirulenz zu erkennen (Abb. 10). Mittels der Durchführung von Stresstests konnte bereits ausgeschlossen werden, dass die Deletion des Gens *um00154* das vegetative Wachstum oder die Resistenz von *U. maydis* gegenüber oxidativem- bzw. Zellwandstress beeinflusst (Abb. 8). Die Komplementation dieses Gens bereitet jedoch enorme

Schwierigkeiten, weshalb das genaue Vorgehen im Folgenden detailliert beschrieben wird.

Zur Komplementation wurde, wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben das Gen *um00154* inklusive 1kb der nativen Promotorregion in den ektopischen *ip*-Lokus der Mutante integriert. Dieser Ansatz führte jedoch nicht zu einer phänotypischen Komplementation der Mutante SG200 Δ *um00154* (Abb. 12 B, SG200 Δ *um00154-um00154*(1kb, EI (= einfache Integration))). Um Fehler bei der Generierung des Deletionsstamms auszuschließen wurden sowohl Deletion wie auch Komplementation wiederholt. Der neu erstellten Deletionsstamm SG200 Δ *um00154* zeigte den gleichen Phänotyp wie zuvor beobachtet, daher sind die Daten nicht zusätzlich in Abbildung 12 dargestellt. Zur Erstellung des Komplementationskonstrukts wurden dieses Mal 2kb der nativen Promotorregion verwendet. Dies änderte jedoch nichts an der Tatsache, dass auch dieses Konstrukt die Mutante nicht komplementieren konnte (Abb. 12 B, SG200 Δ *um00154-um00154*(2kb, EI)).

Da das nächste benachbarte Gen (*um00153*) nur 337 bp von *um00154* entfernt ist (Abb. 12 A), kam der Verdacht auf, dieses evtl. bei der Erstellung der Mutante beschädigt zu haben. Die Folge dessen wäre, dass der beobachtete Phänotyp nicht durch die Deletion des Gens *um00154* entstanden ist, sondern durch eine unbeabsichtigte Schädigung des Gens *um00153* bzw. durch eine Kombination von beidem. Demzufolge wurde in den ektopischen *ip*-Lokus der Mutante SG200 Δ *um00154* das Gen *um00153* inklusive 2kb der nativen Promotor Region integriert. Blattinfektionen des resultierenden Stamms SG200 Δ *um00154-um00153*(2kb nativer Promotor), welcher eine einfache ektopische Integration von *um00153* (EI) enthielt, zeigten eine ähnlich reduzierte Virulenz wie die Deletionsmutante Δ *um00154*. Bei einer mehrfachen ektopischen Integration des Gens (MI = mehrfache Integration) konnte die Virulenz partiell wieder hergestellt werden, die Virulenz des Wildtyps wurde jedoch nicht erreicht (Abb. 12 B, SG200 Δ *um00154-um00153* EI und MI).

Zusätzlich erfolgte, unter Verwendung eines sehr starken Promotors (*pit2*-Promotor), eine Überexpression des Gens *um00154* in der Deletionsmutante SG200 Δ *um00154*. Dieser Überexpressionsstamm (SG200 Δ *um00154-um00154*(P:*pit2*; EI) zeigte eine stärkere Virulenz als die Deletionsmutante SG200 Δ *um00154*, erreichte jedoch nicht die Virulenz von SG200 (Abb. 12 B,

SG200 Δ um00154-um00154(P:pit2; EI). Diese Beobachtung zeigt, dass das Gen *um00154* im Falle einer Überexpression durchaus einen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* hat.

In einem weiteren Ansatz wurde eine durch FRT (*flippase recognition target*) Sequenzen umschlossene Hygromycin-Resistenz-Kassette des Plasmids pHwFRT (Khrunyk *et al.*, 2010) in das Gen *um00154* eingebaut, um das Leseraster zu verschieben und somit die Expression vom Um00154 zu verhindern. Das Insertionskonstrukt wurde durch homologe Rekombination in das Gen *um00154* des Stamms SG200 integriert. In diesen Insertionsstamm wurde anschließend ein selbstreplizierendes FLP- (Flippase) Expressionsplasmid transformiert (pFLPexpc; (Khrunyk *et al.*, 2010)), was ein Flippase basiertes Ausschneiden der Hygromycin-Kassette ermöglichte. Darüber hinaus wurde eine Deletionsmutante SG200 Δ um00154 mit FRT-Sequenzen, welche rechts und links von der Hygromycin-Kassette platziert wurden, hergestellt. Dies machte, wie auch in dem generierten Insertionsstamm, das Flippase basierte Entfernen der Hygromycin-Kassette möglich. Bei der Infektion von Maisblättern mit dem Insertionsstamm und der Deletionsmutante mit FRT-Sequenz war erstaunlicherweise kein Virulenzdefekt mehr zu beobachten (Abb. 12 B, SG200-Insertion-um00154 und SG200 Δ um00154(FRT)).

Die Expression der Gene *um00154* und *um00153* wurde durch *qRT-PCR* in Maisblättern, infiziert mit den Stämmen SG200, SG200 Δ um00154, SG200 Δ um00154-um00154(EI, 2kb), SG200 Δ um00154(+FRT), sowie mit SG200-Insertion-um00154 und SG200 Δ um00154-um00154(P:pit2; EI) ebenfalls analysiert. Das Gen *um00154* war wie gewünscht in den generierten Mutationsstämmen SG200 Δ um00154, SG200 Δ um00154(+FRT) und in dem Insertionsstamm SG200-Insertion-um00154 nicht exprimiert (Abb. 12 C). Die Expression des Gens konnte jedoch durch eine genetische Komplementation nicht wieder auf das Wildtyplevel angepasst werden (Abb. 12 C SG200 Δ um00154-um00154(EI, 2kb) und SG200 Δ um00154-um00154(MI, 2kb)). Zudem war die Expression des Gens *um00153* in dem Deletionsstamm SG200 Δ um00154 sowie in den Komplementationsstämmen SG200 Δ um00154-um00154(EI, 2kb) und SG200 Δ um00154-um00154 (MI, 2kb) stark reduziert. In dem Insertionsstamm SG200-Insertion-um00154 sowie in der Deletionsmutante

mit FRT-Sequenz zeigte *um00153* eine mit dem Wildtyp SG200 vergleichbare Expression (Abb. 12 C).

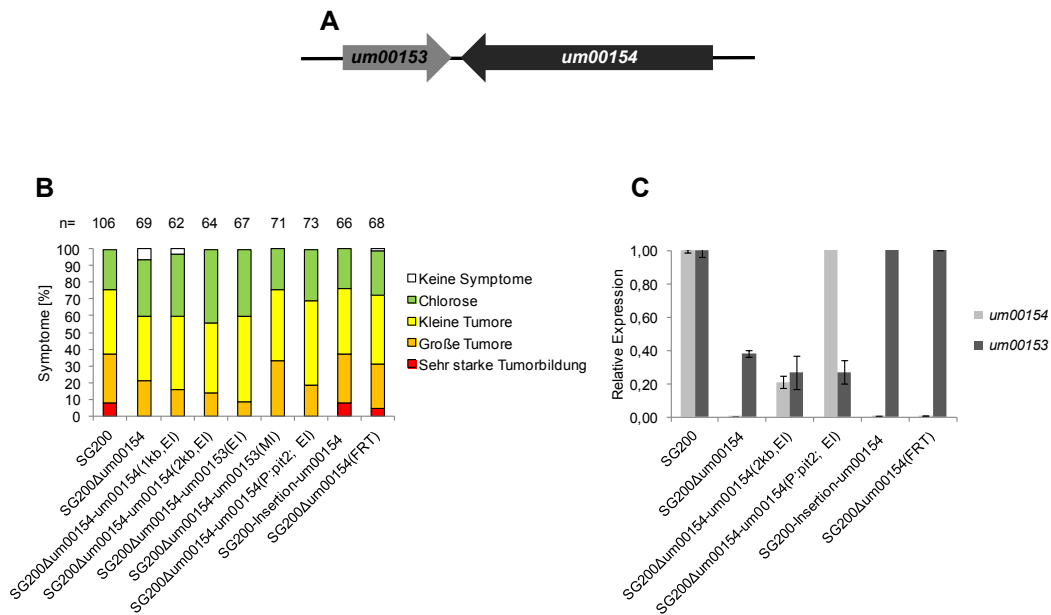


Abbildung 12: Infektions- und Expressionsanalysen von *um00154* und den diesbezüglich generierten Deletions- und Komplementationsstämmen

A: Schematische Darstellung der Lokalisierung von *um00154* und *um00153*

B: Blattinfektionen der *U. maydis* Stämme SG200, SG200Δ*um00154*, SG200Δ*um00154-um00154*(1kb, EI), SG200Δ*um00154-um00154*(2kb, EI), SG200Δ*um00154-um00153*(EI), SG200Δ*um00154-um00153*(MI), SG200Δ*um00154-um00154*(FRT) sowie SG200Δ*um00154-um00154*(P::*pit2*; EI) und SG200-Inserion-*um00154*. Die Bonitur wurde 12 Tage nach der Infektion, von zwei biologischen Replikaten durchgeführt. EI = einfache Integration, MI = mehrfache Integration.

C: Die Expressionshöhe ist in Relation zu der Expression des Wildtyps SG200 angegeben, welcher auf eins gesetzt wurde. Die Genexpression wurde in Maisblättern drei Tage nach der Infektion, in zwei biologischen Replikaten ermittelt.

Anhand der erläuterten Daten kann vermutet werden, dass die Integration der Hygromycin-Resistenz-Kassette in dem bearbeiteten genetischen Bereich einen negativen Effekt auf die Expression der in diesem Bereich lokalisierten Gene hat, was sehr wahrscheinlich die Ursache für den zu Beginn beschriebenen Phänotyp ist.

2.4 Der organspezifische Effektor *um02239* (see1)

Das Effektorgen (*um02239*) liegt auf Chromosom 5 und codiert für das 17,7 kD Protein See1 (= *seedling efficient effector 1*). Bioinformatische Analysen prognostizieren ein 21 Aminosäuren langes Signalpeptid im N-Terminus (SignalP 4.1). *see1* ist in Maisblättern signifikant höher exprimiert als in den

männlichen Blütenständen (Abb. 7). Passend dazu zeigt die Deletionsmutante SG200 Δ see1 eine signifikant reduzierte Virulenz bei Blattinfektionen. In der männlichen Blüte hingegen verursacht die Mutante Krankheitssymptome, die mit denen von Wildtypinfektionen vergleichbar sind (Abb. 9). Darüber hinaus stellte Amey Redkar durch *in vivo* Analyse der DNA-Replikation/-Synthese einen Zellteilungsdefekt der Δ see1 Mutante fest (Redkar, 2014, Redkar *et al.*, 2014 (in Revision)).

2.4.1 See1 interagiert mit dem Zellzyklus- und Immunitätsregulator ZmSGT1

In Vorarbeiten führte Amey Redkar eine Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit See1 und einer normalisierten cDNA-Bank von infiziertem Pflanzenmaterial durch. In diesem Ansatz identifizierte Amey Redkar ein Maishomolog von SGT1 (*suppressor of G2 allele of skp1*) als Interaktionspartner von See1. SGT1 ist ein bekannter Regulator der Zellzyklusprogression in Hefe und ein wichtiger Faktor der Wirts- und Nicht-Wirtsresistenz in Pflanzen. Die TPR (*tetratricopeptide repeat*)-Domäne, CS (*CHORD-SGT1*)-Domäne und SGS (SGT1 spezifisch)-Domäne sind die funktionellen Bereiche von SGT1 (Kitagawa *et al.*, 1999, Peart *et al.*, 2002). Die Sequenz der isolierten Klone beinhaltete die CS- und SGS-Domäne von SGT1 (Abb. 13 A, 14 A). Um herauszufinden welche Bereiche der beiden Proteine miteinander interagieren, wurden diese in mehrere Abschnitte aufgeteilt und mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse auf ihre Interaktion getestet. Für SGT1 wurden neben der kompletten Proteinsequenz, und der Sequenz der isolierten Klone, die folgenden Regionen verwendet: CS (*CHORD-SGT1*)-Domäne (AS: 160-240), SGS (SGT1 spezifisch)-Domäne (AS: 276-362) und CS+SGS-Domäne (AS: 160-362) (Abb. 13 A, 14). Für See1 wurde neben der ganzen Proteinsequenz (ohne Signalpeptid) eine Region gewählt die auch in den Homologen der nahverwandten Spezies *S. reilianum* und *U. hordei* vorhanden ist (konservierte Region (AS: 34-83)), sowie eine C-terminale Region (AS: 57-157) (Abb. 13 B, 14). Unter Verwendung der kompletten SGT1 und der vollständigen See1 Proteinsequenz konnte die zuvor beobachtete Interaktion nicht bestätigt werden. Dies deutet darauf hin, dass im Rahmen der durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse die TPR-Domäne,

welche in der Sequenz der isolierten Klone nicht vorhanden ist, einen für die Interaktion wichtigen Bereich bedeckt (Abb. 14 B). Seitens See1 zeigte die komplette Proteinsequenz die stärkste Interaktion mit allen einzelnen Regionen von SGT1 (Abb. 14 C-E).

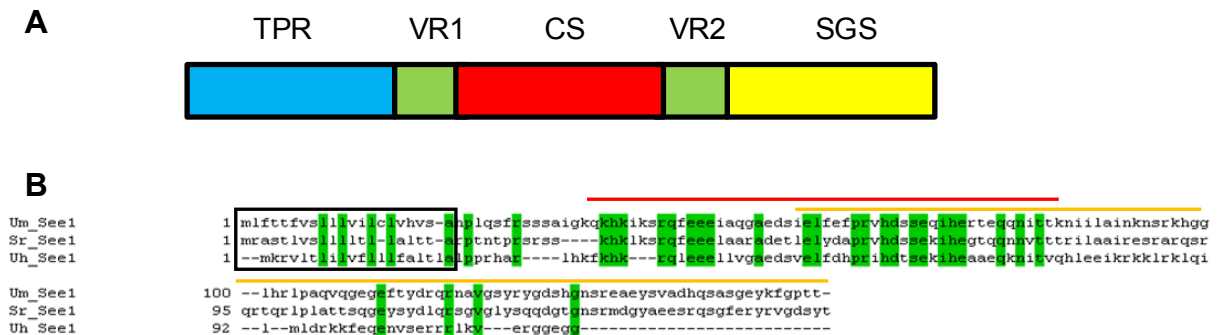


Abbildung 13: Domänen von See1 und SGT1

A: Domänenstruktur von ZmSGT1: TPR = *tetratricopeptide repeat*-Domäne (AS: 1-106; blau), CS = *CHORD*-SGT1-Domäne (AS: 160-240; rot), SGS = SGT1 spezifische-Domäne (AS: 276-362; gelb) und zwei variable Regionen (VR1/2; grün) (SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*; <http://smart.embl-heidelberg.org>))

B: Regioneneinteilung von See1: Die Abbildung zeigt einen Sequenzvergleich von See1 aus *U. maydis* mit den entsprechenden Homologen in *U. hordei* und *S. reilianum*. Für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse erfolgte eine Aufteilung von See1 in eine konservierte Region (AS: 34-83; rot) und eine C-terminale Region (AS: 57-157; gelb). Die komplette Proteinsequenz wurde für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse ohne Signalpeptid (in schwarz) verwendet.

Die stärkste Interaktion mit See1 wurde im Fall von SGT1 für die CS-Domäne beobachtet (Abb. 14 C). Die SGS-Domäne zeigte eine nur sehr schwache Interaktion. Unter Einsatz der kompletten See1 Proteinsequenz und der SGS-Domäne von SGT1 wurde ein Wachstum bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} festgestellt (Abb. 14 D). Interessanterweise zeigte die CS+SGS-Domäne von SGT1 mit der vollen Proteinsequenz von See1 eine ähnlich schwache Interaktion, was darauf hindeutet, dass die SGS-Region den für die Interaktion wichtigen Bereich der CS-Domäne teilweise blockiert (Abb. 14 E). Die TPR-Domäne von SGT1 wurde in diese Analyse nicht weiter einbezogen, da sie in der Sequenz der isolierten Klone der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit der normalisierten cDNA-Bank nicht vorhanden war und keine Interaktion mit der kompletten SGT1 Sequenz gezeigt werden konnte (Abb. 14 B). Die Expression der einzelnen Proteinregionen wurde über eine Western-Analyse nachgewiesen (Abb. 32).

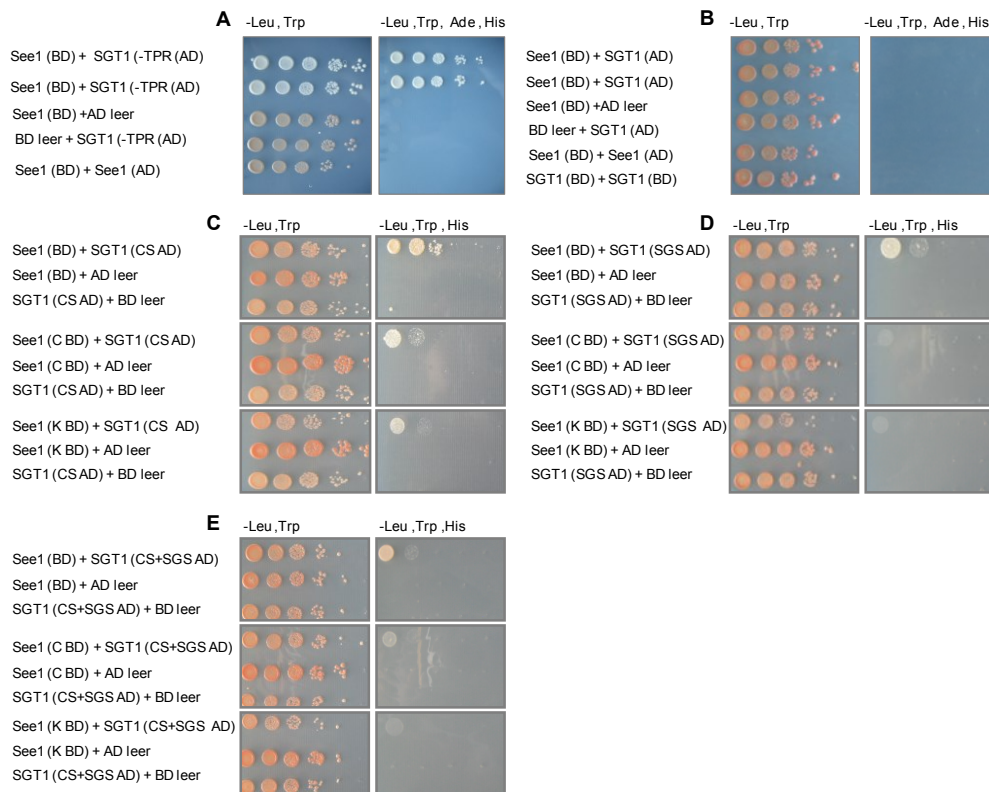


Abbildung 14: Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit See1 und SGT1

A: Interaktion von See1 (ohne Signalpeptid) mit SGT1 (ohne TPR-Region).

B: Interaktion von See1 (ohne Signalpeptid) mit der kompletten Proteinsequenz von SGT1.

C: Interaktion der See1 Regionen mit der CS-Domäne von SGT1.

D: Interaktion der See1 Regionen mit der SGS-Domäne von SGT1.

E: Interaktion der See1 Regionen mit der SGS+CS-Domäne von SGT1.

Die Teststämme wurden in den Verdünnungen 10^0 - 10^{-4} auf die Nährmedienplatten (*low/medium/high stringency*) getropft. Diese wurden 4 Tage bei 28°C inkubiert. BD = Gal4-Bindedomäne, AD = Gal4-Aktivierungsdomäne, SGT1-Domänen: TPR = *tetratricopeptide repeat*-Domäne (AS: 1-106), CS = CHORD-SGT1-Domäne (AS: 160-240), SGS = SGT1 spezifische-Domäne (AS: 276-362), CS+SGS = CHORD-SGT1-Domäne + variable Domäne + SGT1 spezifische-Domäne (AS: 160-362). See1 Regionen: K = konservierte Region (AS: 34-83) und eine C = C-terminale Region (AS: 57-157).

Um die See1-SGT1 Interaktion auch in der Pflanze nachzuweisen wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Dafür wurde an See1 C-terminal ein Myc-tag fusioniert, SGT1 erhielt C-terminal einen 3xHA-tag. Diese Sequenzen wurden jeweils in den Vektor pGreen, ein Vektor für *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Genexpression in *Nicotiana benthamiana*, kloniert und anschließend in *N. benthamiana* heterolog co-exprimiert. Als Expressionskontrollen wurden See1 und SGT1 separat in *N. benthamiana* exprimiert (Abb. 15). Mittels einer anti-HA Matrix konnte See1-Myc durch HA markiertes SGT1 co-immunopräzipitiert werden, dies war jedoch nicht in Abwesenheit von SGT1-HA der Fall (negativ Kontrolle) (Abb. 15).

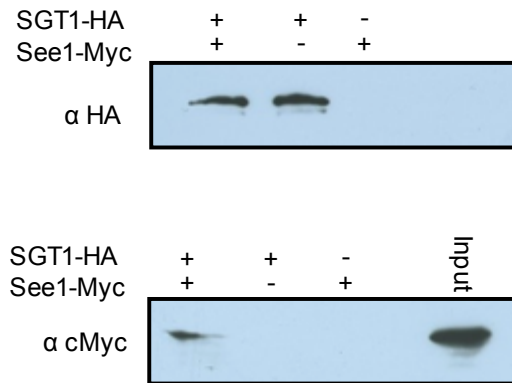


Abbildung 15: Co-Immunopräzipitation von See1-Myc und SGT1-HA

See1-Myc und SGT1-HA wurden in *N. benthamiana* co-exprimiert. Mittels einer anti-HA Matrix, wurde See1-Myc durch HA markiertes SGT1 co-immunopräzipitiert.

Zusätzlich konnte die Interaktion der beiden Proteine *in vivo* durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC = *bimolecular fluorescence complementation*) visualisiert werden. Hierbei wurde eine nach Hemetsberger *et al.*, 2012, leicht modifizierte Methode gewählt, die einen Expressionsnachweis der beiden zu untersuchenden Proteine beinhaltet (eBiFC). Dafür wurden die Nukleotidsequenzen der potenziellen Interaktionspartner mit je einer Hälfte der Nukleotidsequenz des YFP-Chromophores fusioniert (SGT1-C_YFP, See1-N_YFP). Die N-terminale Hälfte des YFP-Chromophores ist hier zusätzlich mit einem mCherry Chromophor und die C-terminale Hälfte mit einem CFP-Chromophor versehen (eBiFC; (Hemetsberger *et al.*, 2012)). Anschließend folgte die ballistische Transformation von epidermalen Maiszellen und die Expression der zu analysierenden Konstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotors. Dabei wird davon ausgegangen, dass nur bei einer direkten Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine die räumliche Nähe der Interaktionspartner zueinander dazu führt, dass die beiden YFP-Fragmente sich aneinander lagern und ein funktionelles Chromophor bilden (Waadt & Kudla, 2008). Bei einer Protein-Protein Interaktion sollte demnach eine YFP-Fluoreszenz in einem bestimmten Kompartiment der Pflanzenzellen mikroskopisch nachzuweisen sein. Bei der Interaktion von See1-SGT1 konnte diese im Cytoplasma und im Nukleus beobachtet werden (Abb. 16 C). Als Expressions- und Negativkontrolle wurde je ein Interaktionspartner mit dem Leervektor (enthält Startcodon vor mCherry bzw. CFP) des korrelierenden BiFC-Konstrukts co-transformiert. Dies

fürte zur Expression von See1 bzw. SGT1 und damit zum Fluoreszenznachweis von mCherry bzw. CFP, nicht aber zur Fluoreszenzkomplementation der beiden YFP-Hälften, da hier keine physikalische Interaktion der Proteine vorlag (Abb. 16 A und B).

Mit den erstellten BiFC-Konstrukten wurde ebenfalls eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Das Vorgehen entsprach exakt der bereits erläuterten Co-Immunopräzipitation, nur dass in diesem Fall die eBiFC-Konstrukte in *N. benthamiana* co-exprimiert wurden. Auffällig war, dass bei diesem Vorgehen drei sehr nah beieinander liegende Banden für das co-immunopräzipitierte See1-mCherry-N_YFP-Myc detektiert wurden, die Ursache dafür ist bisher nicht bekannt (Abb. 16 D).

Die See1-SGT1 Interaktion konnte somit durch zwei voneinander unabhängig biochemische Methoden, sowie durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation nachgewiesen werden. Die weitergehende funktionelle Charakterisierung wird in der Dissertation von Amey Redkar behandelt.

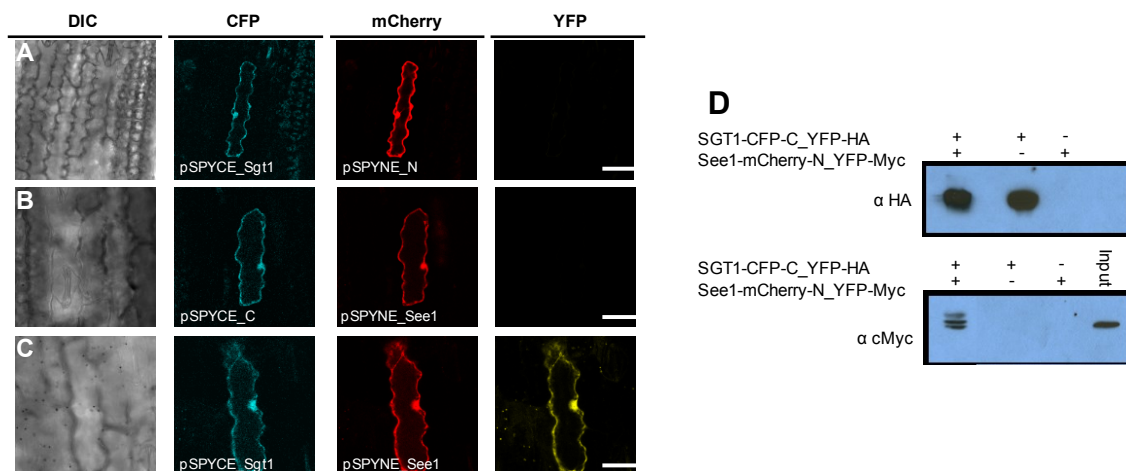


Abbildung 16: *In vivo* bimolekulare Fluoreszenzkomplementation von See1 und SGT1

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die eBiFC-Konstrukte exprimiert in epidermalen *Z. mays* Zellen.

A: Co-Expression von See1 (rot) und dem korrelierenden Leervektor (blau). Es ist eine mCherry- und CFP-Fluoreszenz im Cytoplasma und Zellkern zu sehen, jedoch keine YFP-Fluoreszenz.

Maßstabsbalken = 50 µm

B: Co-Expression von SGT1 (blau) und dem korrelierenden Leervektor (rot). Es ist eine mCherry- und CFP-Fluoreszenz im Cytoplasma und Zellkern zu sehen, jedoch keine YFP-Fluoreszenz.

Maßstabsbalken = 25 µm.

C: Co-Expression von SGT1 (blau) und See1 (rot). Durch Interaktion der beiden Proteine kann zusätzlich eine YFP-Fluoreszenz im Cytoplasma und im Zellkern detektiert werden. Maßstabsbalken = 50 µm.

D: Co-Immunopräzipitation von See1-mCherry-N_YFP-Myc und SGT1-CFP-C_YFP-HA. See1-mCherry-N_YFP-Myc und SGT1-CFP-C_YFP-HA wurden in *N. benthamiana* co-exprimiert. Mittels einer anti-HA Matrix, wurde See1-mCherry-N_YFP-Myc durch HA markiertes SGT1-CFP-C_YFP co-immunopräzipitiert.

2.5 Der organspezifische Effektor *um01829*

Das Gen *um01829* liegt auf Chromosom 3 und codiert für ein 76,4 kD Protein mit einem N-terminalen Signalpeptid (AS: 1-18). Zudem besitzt das Protein eine Galactose-bindende-Domäne (AS: 124-266), eine α -L-Arabinofuranosidase-Domäne (AS: 272-412), einen C-terminalen Bereich einer α -L-Arabinofuranosidase (AS: 512-691), sowie zwei konservierte aktive Zentren einer α -L-Arabinofuranosidase (AS: 410-412, 499) (Abb. 16 A) (SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*); SignalP 4.1). Die Aminosäuresequenz von Um01829 zeigt eine Ähnlichkeit von 81% zu dem Protein Sr12911 von *S. reilianum* und von 72% zu dem Protein Uhor02718 von *U. hordei* (Tab. 1, Abb. 17 A). Das Expressionsprofil von *um01829* ist bei Maisinfektionen signifikant blattspezifisch, wobei die höchste Expression 8 Tage nach der Infektion in Maisblättern festgestellt wurde (Abb. 17 B). Passend dazu war bei Blattinfektionen mit der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 eine signifikant reduzierte Virulenz zu beobachten. Im Falle von Infektionen der männlichen Blüte waren die verursachten Krankheitssymptome nicht von SG200 Infektionen zu unterscheiden (Abb. 9).

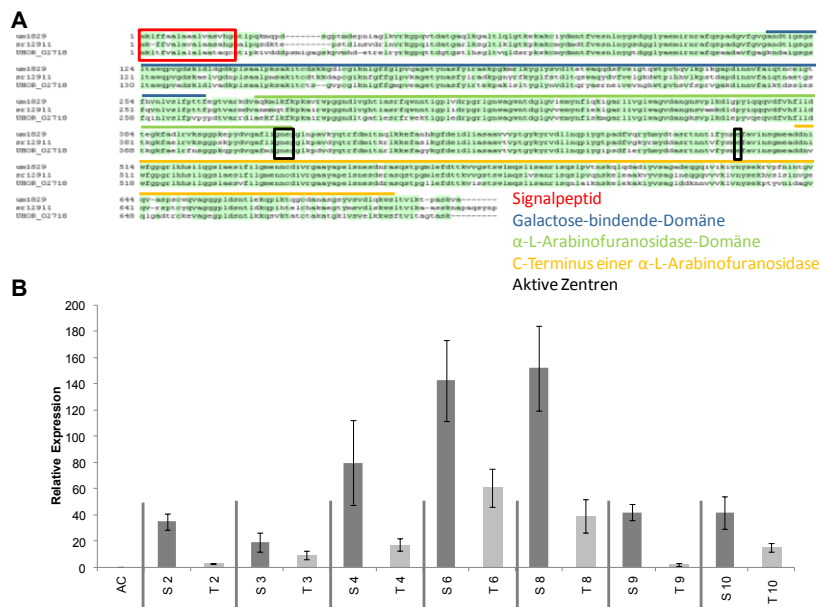


Abbildung 17: Sequenzvergleich von Um01829 aus *U. maydis* mit den Homologen in *U. hordei* / *S. reilianum* und Expressionsprofil von *um01829*

A: Die Aminosäuresequenz von Um01829 zeigt eine Ähnlichkeit von 81% zu dem Protein Sr12911 von *S. reilianum* und von 72% zu dem Protein Uhor02718 von *U. hordei*.

B: Die Expressionshöhe ist in Relation zu der Expression von der *U. maydis* Peptidylprolyl Isomerase (*ppi*) angegeben (Bohlmann, 1996). Die Genexpression wurde in axenischer Kultur (AC), Blättern 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 10 Tage nach der Infektion (S), männlichen Blütenständen 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 10 Tage nach der Infektion (T), in drei biologischen Replikaten ermittelt.

Im Rahmen der Transkriptionsanalyse von Skibbe *et al.*, 2010 konnten neben *um01829* noch zwei weitere *U. maydis* Gene (*um00837*, *um04309*), welche für Proteine mit einer vorhergesagten Funktion als α -L-Arabinofuranosidase codieren und vier, die für prognostizierte Endo-1,4- β -Xylanasen codieren (*um03411*, *um04422*, *um04897*, *um06350*) detektiert werden. Davon besitzen alle außer *Um04897* ein prognostiziertes Signalpeptid (SignalP 4.1). Die zwei *U. maydis* Gene, welche für Proteine mit einer vorhergesagten Funktion als α -L-Arabinofuranosidase codieren (*um00837*, *um04309*) sind, genau wie *um01829*, stark blattspezifisch exprimiert und zwei der Gene (*um04422*, *um06350*), die für Proteine mit einer prognostizierten Funktion als Endo-1,4- β -Xylanasen codieren ebenfalls (Tab. 2) (Skibbe *et al.*, 2010). Transkriptionsanalysen mit Fokus auf die frühe pathogene Enzwicklung von *U. maydis* zeigten eine Induktion von *um01829* sowie für das Gen *um04422*, welches für eine prognostizierte Endo-1,4- β -Xylanase codiert. Die Expression des ebenfalls für eine vorhergesagte Endo-1,4- β -Xylanase codierende Gen *um03411* war zu diesem Zeitpunkt unterdrückt und die Gene *um00837*, *um04309*, *um4897* und *um06350* wurden in diesem Ansatz nicht detektiert (Lanver *et al.*, 2014).

Tabelle 2: *U. maydis* Gene die für Proteine mit einer prognostizierten Funktion als α -L-Arabinofuranosidase oder Endo-1,4- β -Xylanase codieren

*Die vorhergesagte Funktion wurde unter Anwendung der Software PEDANT (Helmholz-Zentrum, München) ermittelt. **Die Expressionswerte Stammen von Skibbe *et al.*, 2010. n.s = nicht signifikant, SP = Signalpeptid, α -L-AF = α -L-Arabinofuranosidase.

Gen	Prognostizierte Funktion*	Expression Blatt 3dpi**	Expression männliche Blüte 3dpi**	Regulation	Expression Blatt 9dpi**	Expression männliche Blüte 9dpi**	Regulation	SP
<i>um00837</i>	α -L-AF	44,80	0,00	Blatt: hoch	46,27	47,97	n.s	ja
<i>um01829</i>	α -L-AF	16593	9649	Blatt: hoch	9931	16045	n.s	ja
<i>um04309</i>	α -L-AF	320,35	118,83	Blatt: hoch	87,55	77,33	n.s	ja
<i>um03411</i>	Endo-1,4- β -Xylanase	89,35	63,25	n.s	59,54	63,25	n.s	ja
<i>um04422</i>	Endo-1,4- β -Xylanase	2402,35	835,53	Blatt: hoch	283,77	430,62	n.s	ja
<i>um04897</i>	Endo-1,4- β -Xylanase	91,69	89,06	n.s	83,20	114,75	n.s	nein
<i>um06350</i>	Endo-1,4- β -Xylanase	59,62	0,00	Blatt: hoch	0,00	0,00	-	ja

2.5.1 Appressorienbildung und Penetrationseffizienz der *U. maydis* Mutante SG200 Δ um01829

Amy Klemd quantifizierte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Appressorienbildung der Mutante SG200 Δ um01829 im Vergleich zum Wildtyp SG200. Dies wurde *in vitro* wie bereits durch Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009 beschrieben durchgeführt. Nach 18 Stunden Inkubation bei 28°C wurden die Pilzzellen mit Calcofluor white (CW) gefärbt um Filamente sichtbar zu machen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnte die GFP-Expression in induzierten Appressorien detektiert und der prozentuale Anteil der Appressorien-bildenden Filamente zur Gesamtzahl aller Filamente bestimmt werden. Dies wurde in drei biologischen Replikaten durchgeführt, wobei immer ca. 100 Filamente gezählt wurden. Es war kein Unterschied in der Appressorienbildung zwischen der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 und dem Referenzstamm SG200 festzustellen (Abb. 18 A).

Um die Penetrationseffizienz der Deletionsmutante zu ermitteln, wurde in den ektopischen *ip*-Lokus der Mutante das linearisierte Plasmid p123-Potef-mCherry integriert. Dies ermöglichte eine Markierung der penetrierenden Hyphen mittels einer Fusion von mCherry an den *otef*-Promotor, welcher in penetrierenden Hyphen konstitutiv aktiv ist. Das dritte Blatt infizierter Maiskeimlinge wurde 27 Stunden nach der Infektion mit CW gefärbt und mikroskopisch analysiert. Da CW nicht in das Pflanzengewebe aufgenommen wird, konnte zwischen penetrierenden Hyphen und Hyphen, die sich ausschließlich auf der Oberfläche befanden, unterschieden werden. Es wurde der prozentuale Anteil penetrierter Appressorien zur Gesamtzahl aller Appressorien-bildender Filamente bestimmt. Dies erfolgte in drei biologischen Replikaten, wobei pro Stamm 100 Appressorien-bildende Filamente gezählt wurden. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Penetrationseffizienz zwischen der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 und dem Wildtyp, somit hat die Deletion von *um01829* unter den getesteten Bedingungen keinen sichtbaren Einfluss auf die Penetrationseffizienz von *U. maydis* (Abb. 18 B).

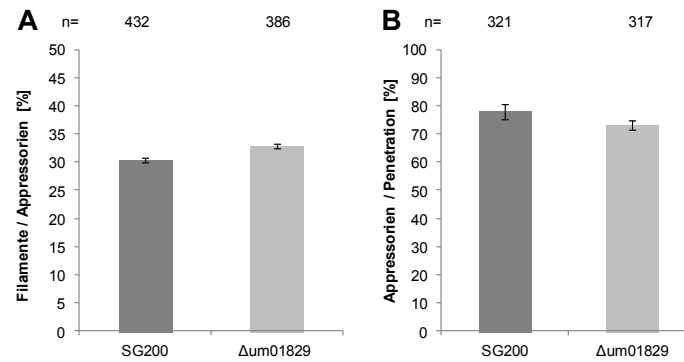


Abbildung 18: Appressorienbildung (A) und Penetrationseffizienz (B) der Mutante SG200Δum01829

A: Appressorien-bildende Filamente auf Parafilm. Die zu analysierenden Stämme wurden mit 2% YEPS_{light} auf eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt und nach Zugabe von 100 μM Hydroxy-Palmitinsäure (HPS) mittels Sprühinokulation auf einen mit Parafilm ausgekleideten Objektträger aufgetragen. Nach 18-stündiger Inkubation bei 28°C wurde die Anzahl Appressorien-bildender Filamente zur Gesamtzahl aller Filamente mikroskopisch bestimmt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

B: Quantifizierung der Penetrationseffizienz. Maispflanzen wurden in drei unabhängigen Replikaten mit den Stämmen SG200-p123-Potef-mCherry und SG200Δum01829-p123-Potef-mCherry infiziert und 27 Stunden nach der Infektion mikroskopisch analysiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil penetrierender Appressorien zur Gesamtzahl aller Appressorien-bildender Filamente bestimmt. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

2.5.2 Sekretion und Lokalisierung des organspezifischen Effektors

Um01829

Die prognostizierte Sekretion von Um01829 während der Maisinfektion, sowie die anschließende Lokalisierung des Proteins wurden in Zusammenarbeit mit Amy Klemd durchgeführt. Um01829 wurde dafür inklusive 1kb Promotorregion in das Plasmid p123-mCherry kloniert, welches anschließend in den ektopischen *ip*-Lokus der Deletinsmutante SG200Δum01829 integriert wurde. Somit wurde Um01829 C-terminal mit einem mCherry-Fluoreszenzmarker versehen. Daraufhin folgte die Infektion von Maisblättern mit diesem Stamm. Drei, sowie vier Tage nach der Infektion wurden die infizierten Blattbereiche mikroskopisch analysiert. Dabei konnte eine Akkumulation der mCherry-Fluoreszenz in der biotrophen Interaktionszone sowie an den Hyphenspitzen detektiert werden, was auf eine Sekretion des Proteins schließen lässt (Abb. 19 A). Zudem wurde eine starke mCherry-Fluoreszenz an den Zell/Zell-Übergängen beobachtet, was auf eine Lokalisierung im Apoplasten oder in der Zellwand hindeutet (Abb. 19 A). Zur genaueren Darlegung der Lokalisation wurde der apoplastische Zwischenraum durch NaCl-induzierte Plasmolyse vergrößert und die behandelten Blätter erneut mikroskopiert. Es

konnte wiederholt eine starke mCherry-Fluoreszenz an den Zell/Zell-Übergängen, sowie eine diffundierte Fluoreszenz in dem apoplastischen Zwischenraum beobachtet werden (Abb. 19 B). Dies ermöglicht die Annahme, dass Um01829 nach der Sekretion zunächst an die Zellwand bindet und anschließend in den apoplastischen Zwischenraum entlassen wird. Da bereits gezeigt wurde, dass es im pflanzlichen Apoplasten zur Abspaltung von Affinitäts-*tags* kommen kann (van Esse *et al.*, 2006), wurde per Western Blot Analyse, unter Verwendung von HA-spezifischen Antikörpern, die Stabilität des Proteins Um01829-mCherry-HA getestet. Hierzu wurden Proteinextrakte von Maisblättern, die mit dem zu untersuchenden *U. maydis* Stamm infiziert und drei, sechs sowie neun Tage nach der Infektion geerntet wurden, verwendet. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper ausschließen zu können, diente SG200 infiziertes Blattmaterial als Negativkontrolle (Abb. 19 C). Das Protein Um01829-mCherry-HA konnte drei und sechs Tage nach der Infektion in der vorhergesagten Größe (104,2 kD) detektiert werden. Neun Tage nach der Infektion war nur ein sehr schwaches, sich an der Detektionsgrenze befindendes, Signal zu beobachten, was jedoch auch der erwarteten Größe von 104,2 kD entsprach (Abb. 19 C). Dieses Ergebnis zeigte, dass die mCherry-Fluoreszenz der Mikroskopieaufnahmen (Abb. 19 A, B) die Lokalisation des gesamten Um01829-mCherry-HA abbilden und es zu keiner Abspaltung des mCherry-Chromophors kommt. Da das detektierte Signal jedoch gerade sechs Tage nach der Infektion, wo *um01829* stark exprimiert wird (vgl. Abb. 17), schwächer ist als nach drei Tagen, ist von einer zeitabhängigen Degradierung des Proteins auszugehen.

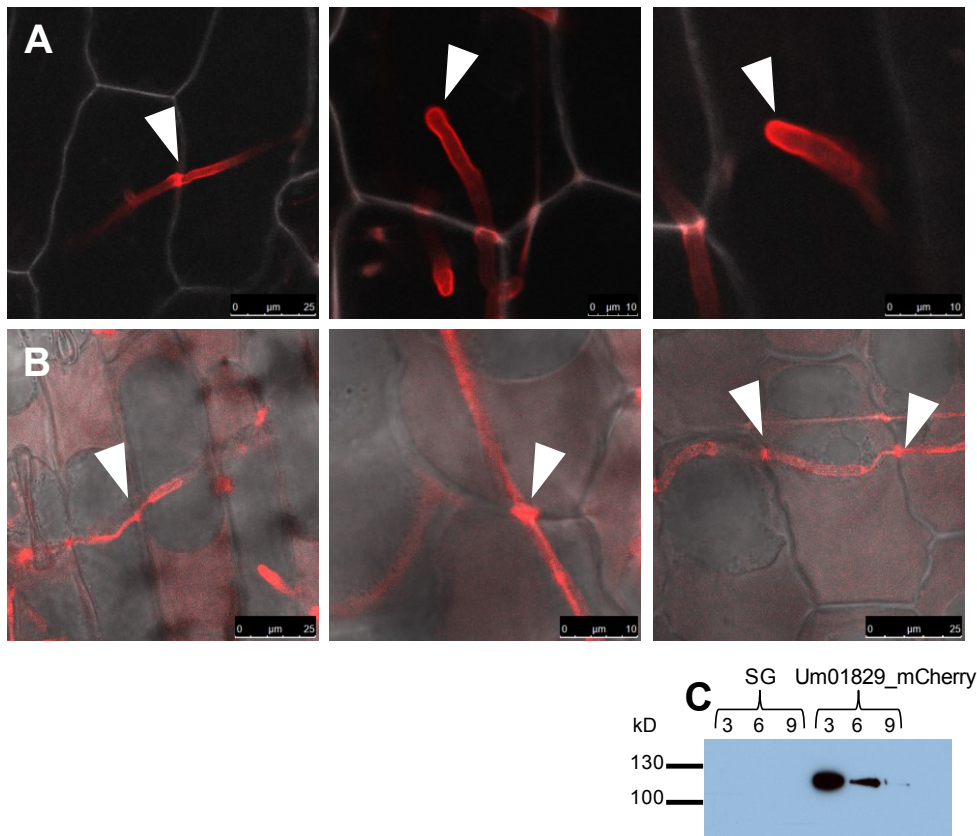


Abbildung 19: Sekretion und Lokalisierung von Um01829

A: Konfokale Aufnahmen intrazellulärer *U. maydis* Hyphen, die eine Sekretion von Um01829-mCherry-HA zeigen. Die Blattproben wurden drei Tage nach der Infektion mikroskopiert.

B: Konfokale Aufnahmen von intrazellulären *U. maydis* Hyphen nach NaCl-induzierter Plasmolyse, die eine Lokalisierung von Um01829 im Apoplasten sowie an Zell/Zell-Übergängen zeigen. Die Blattproben wurden drei Tage nach der Infektion mikroskopiert.

C: Western Blot Analyse, um die Stabilität des *in planta* gebildeten Um01829-mCherry-HA zu testen. Detektiert wurde unter Verwendung eines anti-HA-spezifischen Antikörpers in Protein-Extrakten von *U. maydis* infizierten Maisblättern (3, 6 und 9 Tage nach der Infektion). Erwartete Größe: 104,2 kD. In SG200 infiziertem Blattmaterial wurde kein Signal erwartet.

2.5.3 Mikroskopische Analyse des Deletionsstamms SG200 Δ Um01829

Für die mikroskopische Analyse des Virulenzdefekts der Mutante SG200 Δ Um01829 wurden Maisblätter mit diesem Stamm infiziert und das dritte Blatt zwei, vier und acht Tage nach der Infektion geerntet. Zur Visualisierung der Pilzhyphen im Blatt wurde eine WGA-Alexafluor-488/Propidiumiodid-Färbung (WGA-AF488/PI) durchgeführt. Das Lektin WGA (*wheat germ agglutinin*) bindet an das Chitin der Pilzzellwand und ist an den grün-fluoreszierenden Farbstoff Alexafluor-488 gekoppelt, während Propidiumiodid die Pflanzenzellwand anfärbt. Dadurch werden Pilzhyphen in grün und Pflanzenzellen in rot dargestellt. Die angefärbten Blätter wurden anschließend

mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Zwei Tage nach der Infektion konnte kein sichtbarer Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp ermittelt werden. Vier und acht Tage nach der Infektion zeigte die Mutante jedoch ein vermehrt zirkulär auftretendes Hyphenwachstum innerhalb einer Pflanzenzelle (Abb. 20 A). Bei Erreichen der Zellwand war im Fall der Mutante SG200 Δ um01829 oftmals zu erkennen, dass die Hyphe statt die Zellwand zu durchdringen und somit in die benachbarte Zelle zu gelangen, innerhalb der Zelle in eine andere Richtung weiterwuchs. Um dies zu quantifizieren, wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um einen erfolglosen Penetrationsversuch handelt (Abb. 20 A weiße Pfeile). Bei einer als erfolgreiche Penetration eingeordneten Beobachtung war es der Hyphe möglich, bei Kontakt mit der Zellwand diese direkt zu durchdringen und somit in die benachbarte Zelle zu gelangen (Abb. 20 A graue Pfeile). Die erfolgreiche Zell/Zell-Penetrationen von Hyphen des Wildtyps sowie des Komplementationsstamms lagen zu allen mikroskopierten Zeitpunkten zwischen 81% und 88%. Die Mutante erreichte lediglich zwei Tage nach der Infektion mit 78% diese Effizienz. Vier sowie acht Tage nach der Infektion sank der Anteil an erfolgreichen Penetrationen signifikant auf 36% (vier Tage nach der Infektion) und 32% (acht Tage nach der Infektion) ab (Abb. 20 B).

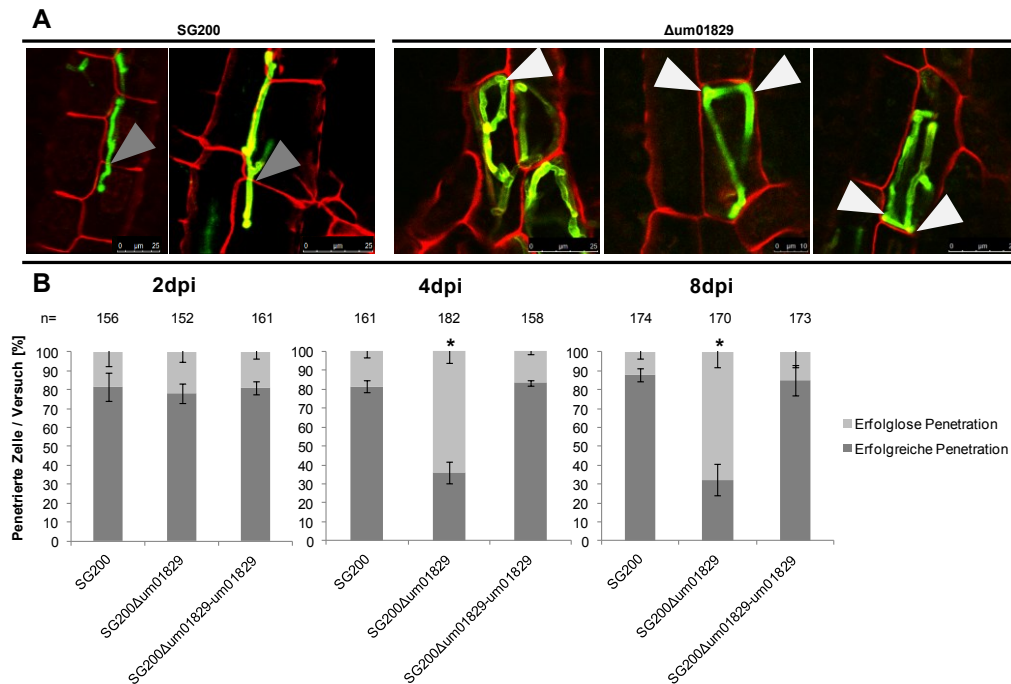


Abbildung 20: Die Deletionsmutante SG200Δum01829 zeigt einen Defekt bei der Zell/Zell-Penetration

A: Mikroskopische Aufnahmen von Maisblättern infiziert mit SG200 und der Mutante SG200Δum01829, vier Tage nach der Infektion. Die Mutante zeigt vermehrt zirkuläres Wachstum innerhalb einer Pflanzenzelle. Zur Visualisierung der Pilzhyphen im Blatt wurde eine WGA-Alexafluor-488/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Die Pilzhyphen sind in grün und Pflanzenzellen in rot dargestellt.

B: Quantifizierung der erfolgreich oder erfolglos penetrierten Pflanzenzellen 2, 4 und 8 Tage nach der Infektion mit den Stämmen SG200, SG200Δum01829 und SG200Δum01829-um01829 (Komplementation). Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. * = $p \leq 0,005$, n = gezählte Penetrationsversuche.

2.5.4 Expression und Aufreinigung von Um01829

Als Voraussetzung für *in vitro* Experimente mit Um01829 wurde das Protein zunächst exprimiert und aufgereinigt. Die heterologe Expression in *Escherichia coli* ergab nur eine sehr geringe Proteinkonzentration in der löslichen Fraktion, da ein großer Teil des exprimierten Proteins unlöslich vorlag und es zudem zur Degradierung des löslichen Proteins kam. Auch unterschiedliche Inkubationstemperaturen (16°C, 28°C, 37°C), Inkubationszeiten (2, 4, 8, 16 und 20 Stunden) oder die Verwendung unterschiedlicher Zellaufschlussverfahren (Sonifikation, *French Press*), zeigten keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das Expressionssystem gewechselt und das Protein Um01829 in dem Überstand von *Pichia pastoris* exprimiert. Die beste Expression konnte hier 36 Stunden nach der Induktion mit Methanol bei 28°C erreicht werden (Abb. 21

A/1). Das exprimierte Protein wurde anschließend durch Ni-NTA aufgereinigt. Abbildung 21 zeigt eine SDS-PAGE (B) und ein Western Blot (C) mit den einzelnen Fraktionen einer Aufreinigung. Nach der Ni-NTA Aufreinigung zeigte die SDS-PAGE zwei zwischen 70 kD und 100 kD liegende Banden. In der Western Blot Analyse, unter Verwendung von Histidin-spezifischen Antikörpern, konnte jedoch nur die größere Bande detektiert werden. Demzufolge kam es nachdem das Hexahistidin-*tag* von Um01829 an die Ni-NTA Matrix gebunden hatte zu einer partiellen Abspaltung des Hexahistidin-*tags*. Mittels Dialyse wurde das aufgereinigte Protein in den gewünschten Puffer umgepuffert und anschließend konzentriert. Die Lagerung erfolgte unter Zugabe von 25% Glycerol bei -20°C .

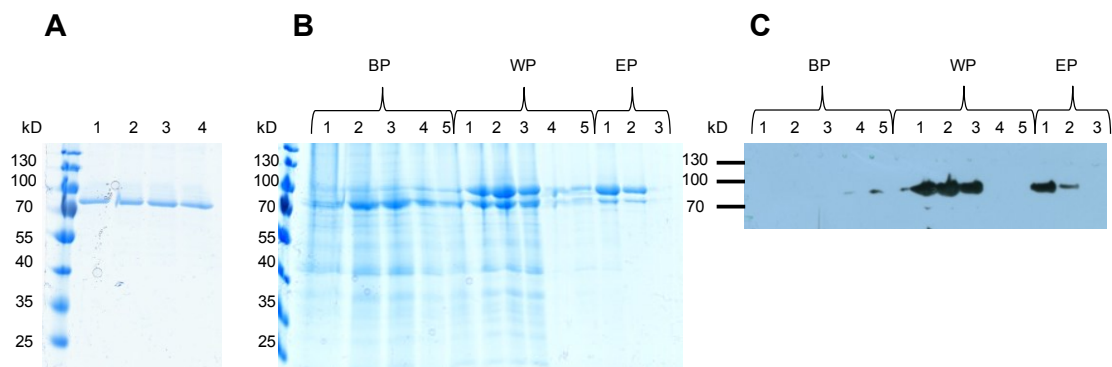


Abbildung 21: Heterologe Expression und Aufreinigung von Um01829

A: SDS-PAGE der Expression von Um01829 (1), Um01829^{mutAS410-412} (2), Um01829^{mutAS499} (3) und Um01829^{mutAS410-412+499} (4). Um01829 sowie alle mutierten Versionen sind mit einem N-terminalen Hexahistidin- und HA-*tag* versehen und die erwartete Größe beträgt 88,4 kD. Die Proteine wurden heterolog in dem Überstand von *P. pastoris* durch Methanol-Induktion überexprimiert. Für die Expression wurde der Vektor Ppic9 verwendet und die Inkubationszeit betrug 36 Stunden bei 28°C .

B: SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen einer Ni-NTA Aufreinigung von Um01829, überexprimiert im Überstand von *P. pastoris*. BP = Bindepuffer, WP = Waschpuffer, EP = Elutionspuffer.
C: Western Blot Analyse der einzelnen Fraktionen einer Ni-NTA Aufreinigung von Um01829, überexprimiert im Überstand von *P. pastoris*. Die Detektion erfolgte unter Verwendung von Histidin-spezifischen Antikörpern. BP = Bindepuffer, WP = Waschpuffer, EP = Elutionspuffer.

2.5.5 Um01829 zeigt eine α -L-Arabinofuranosidase Aktivität

Das Protein Um01829 hat eine prognostizierte Funktion als α -L-Arabinofuranosidase. Um diese Vorhersage experimentell zu testen, wurden Enzymaktivitätstests mit mehreren ausgewählten synthetischen und natürlichen Substraten durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Generierung von Um01829 Versionen mit Punktmutationen an den Bereichen die eine prognostizierte Relevanz für die enzymatische Aktivität als α -L-Arabinofuranosidase haben. Diese mutierten Versionen wurden ebenfalls in *P. pastoris* überexprimiert,

aufgereinigt und in den folgenden Assays getestet (Abb. 21 A/3-4 (Überexpression), Abb. 33 (Aufreinigung)). Insgesamt erfolgte eine Expression von drei verschiedenen mutierten Um01829 Proteinen. In einem ersten Ansatz wurden die für die Aminosäuren Glycin (AS: 410), Asparagin (AS: 411) und Glutaminsäure (AS: 412), codierenden Sequenzabschnitte mit Punktmutationen adressiert und die entsprechenden Basentriplets durch für Alanin codierende Triplet ersetzt (Um1829^{mutAS:410-412}) (Abb. 21, 22). Dieser Bereich des Proteins besitzt eine prognostizierte Funktion als Proton Donor bzw. Akzeptor (UniProt Consortium, 2014). Die zweite mutierte Form enthält statt der Aminosäure Glutaminsäure (AS: 499) Alanin (Um1829^{mutAS499}) (Abb. 21, 22). Diese Proteinregion hat eine vorhergesagte Funktion als Nucleophil (UniPort Consortium, 2014). Die Dritte mutierte Version von Um01829 beinhaltet beide beschriebenen Punktmutationen (Um1829^{mutAS410-412+499}) (Abb. 21, 22).

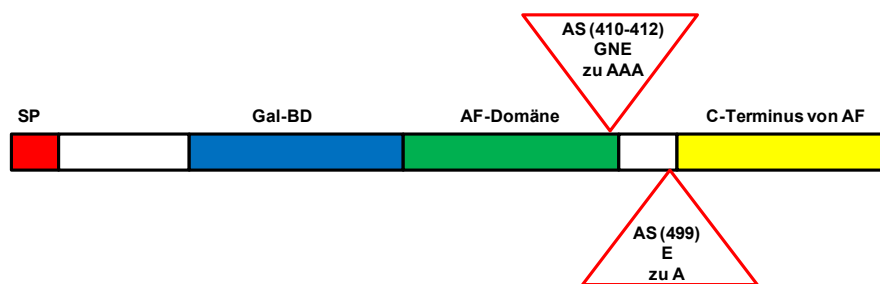


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Proteins Um01829 mit eingefügten Punktmutationen
 Die Grafik zeigt prognostizierte Domänen von Um01829 sowie Bereiche mit einem vorhergesagten Einfluss auf die enzymatische Aktivität als α -L-Arabinofuranosidase (AS: 410-412, 499). Die für die Aminosäuren Glycin (G: 410), Asparagin (N: 411) Glutaminsäure (E: 412 und E: 499) codierenden Sequenzabschnitte wurden mit Punktmutationen adressiert und die entsprechenden Basentriplets durch für Alanin (A) codierende Triplet ersetzt. SP = Signalpeptid, Gal-BD = Galactose-bindende-Domäne, AF-Domäne = α -L-Arabinofuranosidase-Domäne, C-Terminus von AF = C-Terminus von α -L-Arabinofuranosidase (SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*)).

Für viele bereits charakterisierte α -L-Arabinofuranosidase konnte gezeigt werden, dass diese neben der Fähigkeit α -L-1,2-, α -L-1,3- und α -L-1,5- α -L-Arabinofuranosyl-Reste von arabinosehaltigen Substraten zu hydrolysieren, ebenfalls in der Lage sind β -D-Xylopyranose von unterschiedlichen Substraten zu spalten (Chavez *et al.*, 2006). Daher wurde Azurin (blauer Farbstoff) gefärbtes Weizenxylan als Substrat verwendet. Dies hydrolysiert in Wasser, ist jedoch nicht wasserlöslich. Sobald das Xylan enzymatisch gespalten wird, entstehen wasserlösliche Azurinpartikel, die spektrometrisch detektiert werden können. Weizenxylan besitzt, wie das Xylan von Mais ebenfalls,

Arabinoseseitenketten (Hespell *et al.*, 1997). Dieses Assay detektiert daher eine Abspaltung der Arabinoseseitenketten, sowie eine Spaltung des Heteroxylangerüsts als Aktivität. Da für die Durchführung ein großes Probenvolumen notwendig ist, wurde in diesem Falle der unaufgereinigte jedoch aufkonzentrierte *P. pastoris* Überstand verwendet. Die konzentrierten *P. pastoris* Überstände wurden mit Natriumphosphatpuffer auf eine Proteinkonzentration von 3,35 μ M eingestellt. Pro Probe wurden 60 mg Azurin gefärbtes Weizenxyylan in Form einer Tablette verwendet. Nach 2, 4, 8, 16, 32 und 64 Minuten erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption bei 590 nm. Als Positivkontrolle wurde eine vom Hersteller empfohlene, kommerziell erhältliche Xylanase von *Trichoderma longibrachiatum*, ebenfalls mit einer Proteinkonzentration von 3,35 μ M verwendet. Diese zeigte enzymatische Aktivitäten zwischen 374,4 mUnits/ml (2 min) und 1165,8 mUnits/ml (64 min). Für Um01829 konnten Aktivitäten zwischen 58,5 mUnits/ml (2 min) bis hin zu 402,7 mUnits/ml (64 min) detektiert werden. Bei den mutierten Versionen von Um01829 (Um1829^{mutAS:410-412}, Um1829^{mutAS:499}, Um1829^{mutAS:410-412+499}), sowie bei dem verwendeten Assaypuffer und dem nicht induzierten *P. pastoris* Stamm (Um01829 n.i.), konnten keine Aktivitäten detektiert werden (Abb. 23). Die Proteinbereiche (AS: 410-412 und AS: 499) scheinen somit für die enzymatische Funktion von Um01829 essentiell zu sein. Die genannten Werte beziehen sich auf den Mittelwert der angefertigten drei biologischen Replikate. Eine Unit definiert hier die Enzymmenge, die unter Standardbedingungen, pro Minute ein Mikromol reduzierte Zucker von dem Substrat Arabinoxylan freisetzt.

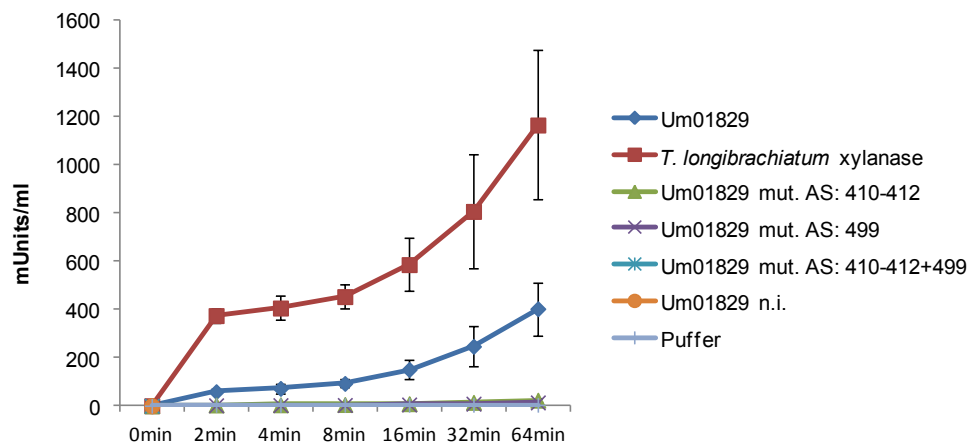


Abbildung 23: Enzymaktivität von Um01829 unter Verwendung von Azurin gefärbtem Weizenxylan als Substrat

Für das Assay betrug die Proteinkonzentration von Um01829, sowie der mutierten Versionen und der α -L-Arabinofuranosidase von *Trichoderma longibrachiatum* (Positivkontrolle) $3,35 \mu\text{M}$. Als Substrat wurden 60 mg Azurin gefärbtes Weizenxylan in Form einer Tablette eingesetzt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 1-8 sowie 10, 12 und 14 Minuten. Bei Um01829 n.i. handelt es sich um den Überstand einer *P. pastoris* Kultur, deren Expression nicht durch Methanolzugabe induziert wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Replikate und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

In einem weiteren Assay wurde das synthetische Substrat 4-Nitrophenyl α -L-Arabinofuranoside in einer Konzentration von 5 mM verwendet. Dieses Assay beruht auf dem Prinzip, dass bei enzymatischer Hydrolyse des farblosen 4-Nitrophenyl α -L-Arabinofuranoside in Arabinose und 4-Nitrophenyl gespalten wird. 4-Nitrophenyl färbt sich bei Zugabe von 2%igem Tri-Natriumphosphat-Puffer gelb und dessen Absorption kann photometrisch bei 400 nm gemessen werden. Somit gilt, je höher die gemessene Absorption, desto höher die enzymatische Aktivität der Probe. Für dieses Assay wurden die aufgereinigten Proteine in einer Proteinkonzentration von $1,34 \mu\text{M}$ eingesetzt. Nach 1-8 sowie 10, 12, und 14 Minuten wurde die Absorption der einzelnen Proben gemessen. Als Positivkontrolle diente eine kommerziell erhältliche α -L-Arabinofuranosidase von *Aspergillus niger* (Megazyme, Irland). Die für dieses Enzym detektierte absolute Absorption lag zwischen 0,6 (1 min) und 1,9 (14 min). Für Um01829 konnten Absorptionen von 0,4 (1 min) bis 1,3 (14 min) gemessen werden. Die Absorptionen der mutierten Versionen von Um01829 (Um01829^{mutAS:410-412}, Um01829^{mutAS:499}, Um01829^{mutAS:410-412+499}), sowie des Assaypuffers waren zu allen Zeitpunkten kleiner als 0,2 (Abb. 24 A). Das Assay wurde zusätzlich mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen, variierend von 0,4 mM bis 4,8 mM in 0,2 mM Schritten, durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug in diesem Fall 10 Minuten. Die detektierte Absorption der Positivkontrolle lag zwischen 0,2 (0,4

mM) und 1,7 (4,8 mM), die des Proteins Um01829 reichte von 0,1 (0,4 mM) bis 1,0 (4,8 mM) und die der mutierten Versionen (Um1829^{mutAS:410-412}, Um1829^{mutAS:499}, Um1829^{mutAS:410-412+499}), sowie des Assaypuffers war bei allen verwendeten Substratkonzentrationen kleiner als 0,2 (Abb. 24 B). Demnach besitzt Um01829 die Fähigkeit 4-Nitrophenyl α -L- Arabinofuranoside, in α -L Arabionofuranose und 4-Nitrophenyl zu spalten, wofür die Aminosäuren Glycin (AS: 410), Asparagin (AS: 411) und Glutaminsäure (AS: 412, 499) essentiell sind. Dies lässt darauf schließen, dass Um1829 in der Lage ist, Arabinofuranosyl-Reste von arabinosehaltigen Substraten zu hydrolysieren.

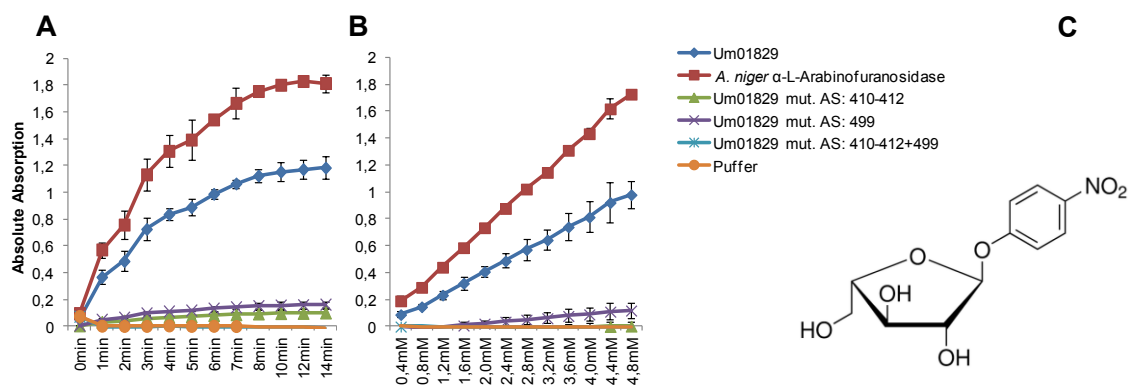


Abbildung 24: Enzymaktivität von Um01829 unter Verwendung des synthetischen Substrats 4-Nitrophenyl α -L- Arabinofuranoside

A: Kinetik mit unterschiedlichen Inkubationszeiten: Für das Assay betrug die Proteinkonzentration von Um01829 sowie der mutierten Versionen (Um1829^{mutAS:410-412}, Um1829^{mutAS:499}, Um1829^{mutAS:410-412+499}) und der α -L-Arabinofuranosidase von *Aspergillus niger* (Positivkontrolle) 1,34 μ M. Das Substrat 4-Nitrophenyl α -L-Arabinofuranoside wurde in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 1-8 sowie 10, 12 und 14 Minuten. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Replikate und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

B: Kinetik mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen: Für das Assay betrug die Proteinkonzentration von Um01829 sowie der mutierten Versionen (Um1829^{mutAS:410-412}, Um1829^{mutAS:499}, Um1829^{mutAS:410-412+499}) und der α -L-Arabinofuranosidase von *Aspergillus niger* (Positivkontrolle) 1,34 μ M. Das Substrat 4-Nitrophenyl α -L-Arabinofuranoside wurde in Konzentrationen zwischen 0,4 mM - 4,8 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Replikate und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

C: Struktur des synthetischen Substrats 4-Nitrophenyl α -L- Arabinofuranoside

Darüber hinaus wurde die enzymatische Aktivität des aufgereinigten Proteins Um01829 und dessen mutierten Versionen ebenfalls unter Verwendung der synthetischen Substrate 4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside, 4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside und 4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside analysiert. Das Substrat 4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside wurde ausgewählt, um zu überprüfen, ob Um01829 in der Lage ist das Xylan Hauptgerüst, bestehend aus (1 \rightarrow 4)-verknüpften β -D-Xylopyranosyl-Resten, zu spalten. Durch Einsatz der

Substrate 4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside und 4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside sollte getestet werden, ob Um01829 neben Arabinofuranosyl-Resten auch andere in der pflanzlichen Zellwand vorhandene Zuckerreste abspalten kann. α -D-Glucoseeinheiten bilden Amylose und Amylopektin und α -D-Galactopyranosylreste sind häufig als Seitenketten an Xylan angehängt.

Die Substrate wurden im Falle einer zeitabhängigen Kinetik in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt und die Absorption nach 1-8 sowie 10,12 und 14 Minuten gemessen. Die verwendete Proteinkonzentration betrug 1,34 μ M. Zusätzlich wurden kinetische Analysen durchgeführt, bei denen die Substratkonzentration von 0,4 mM bis hin zu 4,8 mM in 0,2 mM Schritten erhöht wurde. Die Inkubationszeit betrug hier 10 Minuten und es wurden 1,34 μ M Protein eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten die kommerziell erhältlichen Enzyme β -Xylosidase von *Selenomonas ruminantium*, α -Glucosidase von *Bacillus stearothermophilus* und α -Galactosidase von *Aspergillus niger* (Megazyme, Irland). Das Protein Um01829, seine mutierten Versionen (Um1829^{mutAS:410-412}, Um1829^{mutAS:499}, Um1829^{mutAS:410-412+499}), sowie die verwendeten Assaypuffer zeigten unter Einsatz dieser Substrate keine detektierbare Aktivität (Abb. 25).

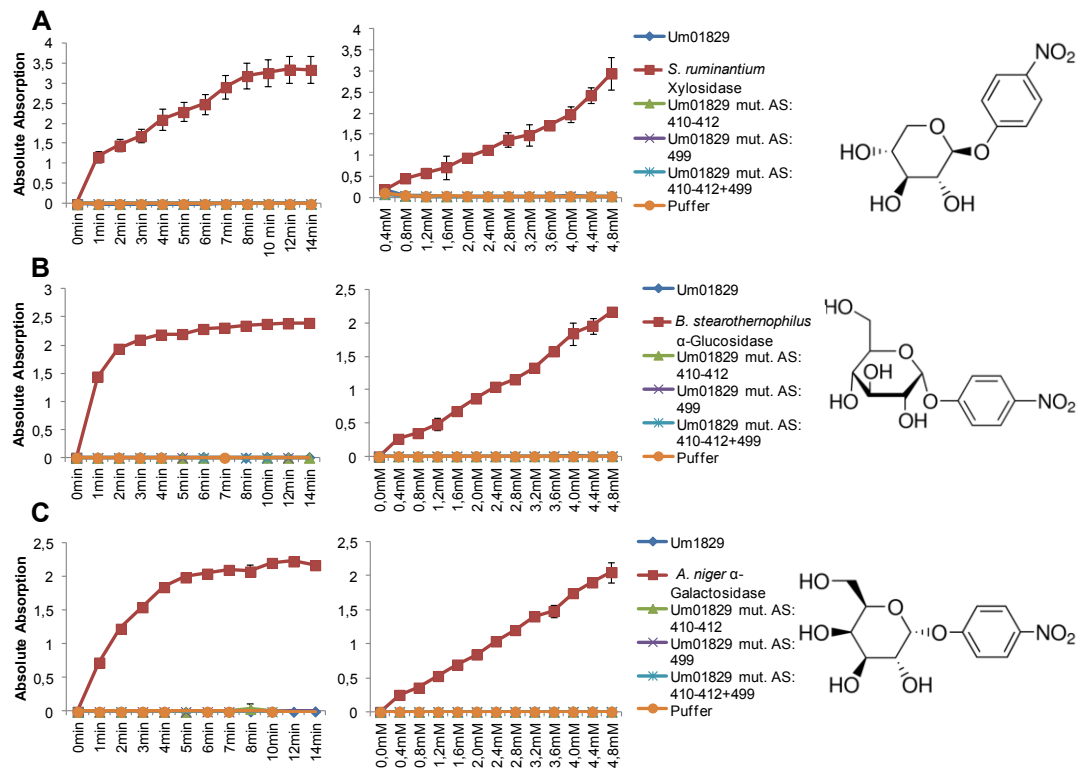


Abbildung 25: Enzymaktivität von Um01829 unter Verwendung der synthetischen Substrate 4-Nitrophenyl β-D-Xylopyranoside (A), 4-Nitrophenyl α-D-Glucopyranoside (B) und 4-Nitrophenyl α-D-Galactopyranoside (C)

A: Assay mit 4-Nitrophenyl β-D-Xylopyranoside als Substrat (**rechts** = Substratstruktur). Kinetik mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (**links**): Für das Assay betrug die Proteinkonzentration von Um01829, sowie der mutierten Versionen (Um01829^{mutAS:410-412}, Um01829^{mutAS:499}, Um01829^{mutAS:410-412+499}) und der β-Xylosidase von *S. ruminantium* (Positivkontrolle) 1,34 μM. Das Substrat wurde in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Kinetik mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (**mittig**): Für das Assay betrug die Proteinkonzentration von Um01829, sowie der mutierten Versionen (Um01829^{mutAS:410-412}, Um01829^{mutAS:499}, Um01829^{mutAS:410-412+499}) und β-Xylosidase von *S. ruminantium* (Positivkontrolle) 1,34 μM. Das Substrat wurde in Konzentrationen zwischen 0,4 mM - 4,8 mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Replikate und die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

B: Assay mit 4-Nitrophenyl α-D-Glucopyranoside als Substrat. Als Positivkontrolle wurde eine α-Glucosidase von *B. stearotheophilus* verwendet. Alle weiteren Details sind mit den Angaben in Abschnitt A identisch.

C: Assay mit 4-Nitrophenyl α-D-Galactopyranoside als Substrat. Als Positivkontrolle wurde eine α-Galactosidase von *A. niger* verwendet. Alle weiteren Details sind mit den Angaben in Abschnitt A identisch.

Demzufolge besitzt das Protein Um01829 nicht die Fähigkeit das lineare Xylan-Hauptgerüst, welches (1→4)-verknüpfte β-D-Xylopyranosyl-Reste beinhaltet, zu spalten. Darüber hinaus zeigt das Protein eine hohe enzymatische Spezifität für die Abspaltung von Arabinoseseitenketten, da unter Verwendung anderer ebenfalls in der pflanzlichen Zellwand anwesender Zucker (Glucopyranose, Galactopyranose) keine Aktivität beobachtet werden konnte (Abb. 26 und Tab. 3).

Tabelle 3: Übersicht der für die Enzymaktivitäts-Assays verwendeten Substrate

Die Tabelle zeigt die eingesetzten Substrate sowie die detektierten enzymatischen Aktivitäten von Um01829 und dessen mutierten Versionen (Um1829^{mutAS:410-412}, Um1829^{mutAS:499}, Um1829^{mutAS:410-412+499}).

Substrat	Enzymatische Aktivität von Um01829	Enzymatische Aktivität von Um1829 ^{mutAS:410-412}	Enzymatische Aktivität von Um1829 ^{mutAS:499}	Enzymatische Aktivität von Um1829 ^{mutAS:499}
Azurin gefärbtes Weizenxylan	Ja	Nein	Nein	Nein
4-Nitrophenyl α -L-Arabinofuranoside	Ja	Nein	Nein	Nein
4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside	Nein	Nein	Nein	Nein
4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside	Nein	Nein	Nein	Nein
4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside	Nein	Nein	Nein	Nein

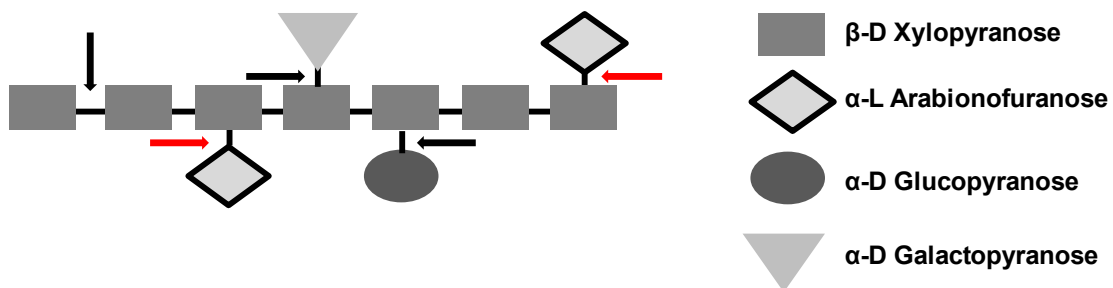


Abbildung 26: Vereinfachte Darstellung eines pflanzlichen Xylans und der Verbindungen die von Um01829 hydrolysiert werden können

Die mit roten Pfeilen markierten Verbindungen können von Um01829 hydrolysiert werden. Die mit schwarzen Pfeilen versehenen Verbindungen können nicht von Um01829 gespalten werden.

2.5.6 Einfluss der enzymatischen Aktivität von Um01829 auf die Virulenz von *U. maydis*

Um herauszufinden inwieweit die identifizierte enzymatische Aktivität als α -L-Arabinofuranosidase von Um01829 einen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* hat, wurden die bereits in Abschnitt 2.5.5 beschriebenen enzymatisch inaktiven Versionen von Um01829, unter Verwendung des nativen Promotors, in den *ip*-Lokus der *U. maydis* Deletionsmutante SG200 Δ um01829 integriert. Mit den generierten *U. maydis* Stämmen (SG200 Δ um01829-Um1829^{mutAS:410-412}, SG200 Δ um01829-Um1829^{mutAS:499}, SG200 Δ um01829-Um1829^{mutAS:410-412+499}) wurden anschließend Blattinfektionen durchgeführt, welche 12 Tage nach der Infektion bonitiert wurden. Die Stämme mit enzymatisch inaktivem Um01829 verursachten im Gegensatz zu der Mutante SG200 Δ um01829 alle Formen von Krankheitssymptome, die auch bei Wildtypinfektionen beobachtet wurden. Die Anzahl der Pflanzen, die große Tumore aufwiesen oder unter einer sehr ausgeprägten Tumorbildung litten war jedoch deutlich geringer (Abb. 27). Somit

zeigten die enzymatisch inaktiven Versionen von Um01829 eine schwache phänotypische Komplementation. Daraus kann geschlossen werden, dass die enzymatische Aktivität als α -L-Arabinofuranosidase von Um01829 einen partiellen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis* hat. Der Effektor Um01829 scheint somit neben seiner Funktion als α -L-Arabinofuranosidase noch eine, oder sogar mehrere virulenzrelevante Funktionen zu besitzen.

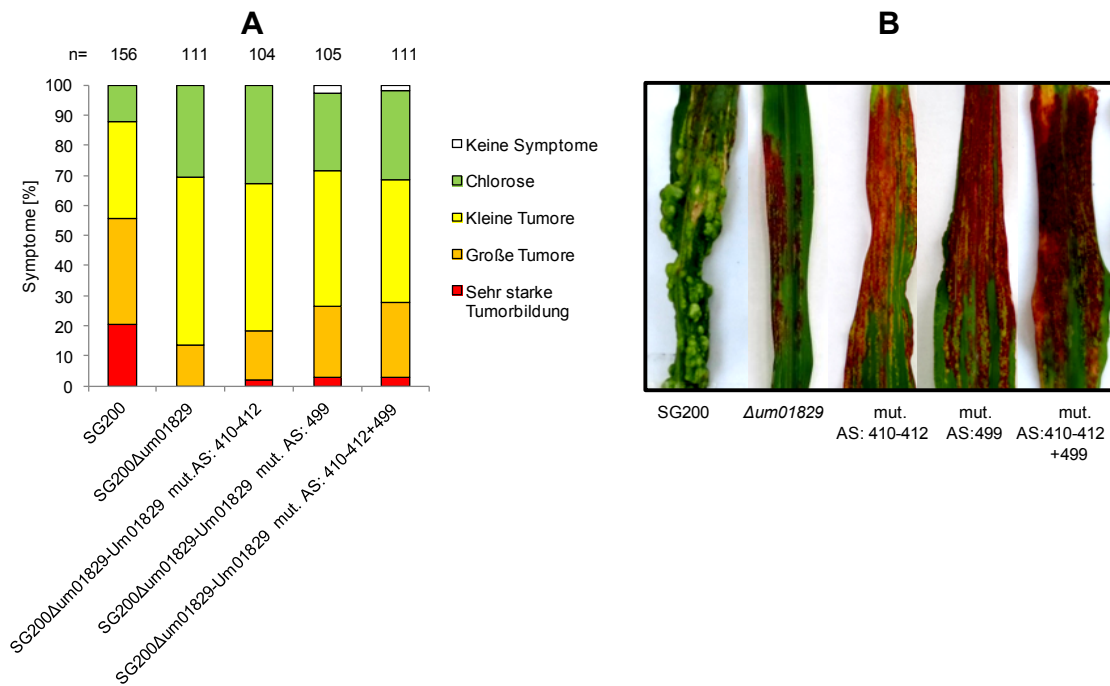


Abbildung 27: Virulenz von *U. maydis* Stämmen mit enzymatisch inaktiven Um01829

A: Quantifizierung von Infektionssymptomen auf Maisblättern nach Infektion mit den *U. maydis* Stämmen SG200, SG200 Δ um01829, SG200 Δ um01829-Um01829^{mutAS:410-412}, SG200 Δ um01829-Um01829^{mutAS:499}, und SG200 Δ um01829-Um01829^{mutAS:410-412+499}.

B: Infektionssymptome ausgelöst durch die in A beschriebenen *U. maydis* Stämme.

3 Diskussion

3.1 Organspezifität der identifizierten und charakterisierten *U. maydis* Effektoren

Im Rahmen dieser Arbeit war es erstmals möglich organspezifische Virulenzfaktoren von *U. maydis* zu identifizieren und charakterisieren. Für neun der getesteten Kandidaten konnte eine organspezifische Aktivität nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Annahme, dass *U. maydis* individuelle Effektoren einsetzt, um die unterschiedlichen Organe seiner Wirtspflanze effektiv zu kolonisieren. Die Deletion der Gene *um06223* und *um12217* führte zu reduzierte Virulenz in Maisblättern sowie in der männlichen Blüte. Im Fall von *um06223* wurde ein pleiotropher Phänotyp beobachtet. So zeigte die Mutante neben der reduzierten Virulenz eine geringere Toleranz gegenüber Zellwandstress und eine beeinträchtigte Filamentbildung. Diese generell reduzierte Fitness der Mutante ist eine wahrscheinliche Ursache für den beobachteten Virulenzdefekt. Bei der Deletion des Gens *um12217* war ein solcher Wachstumsdefekt nicht zu erkennen. Das Expressionsprofil des Gens *um12217* wies jedoch drei Tage nach der Infektion eine Induktion sowohl in Maisblättern als auch in der männlichen Blüte auf, was darauf hindeutet, dass es sich hier um einen allgemeinen Virulenzfaktor ohne eine organspezifische Aktivität handelt. Neun der 11 Gene, deren Deletion eine reduzierte Virulenz zur Folge hatte, codieren für Proteine ohne eine prognostizierte Funktion. Für die funktionelle Analyse dieser Kandidaten wäre eine Identifikation möglicher Wirtsinteraktionspartner sehr hilfreich. Dies könnte im Rahmen einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer normalisierten cDNA-Bank von infiziertem Pflanzenmaterial erfolgen.

Die identifizierten Phänotypen in dieser Arbeit waren alle quantitativ, was bedeutet, dass graduelle Unterschiede in der Virulenz beobachtet wurden, die durch eine reduzierte Tumorgröße und -anzahl erkennbar waren. Keine der getesteten Mutanten zeigte einen vollständigen Verlust der Pathogenität. Ein Grund für solch eine partiell reduzierte Virulenz könnte ein organspezifischer funktioneller Schwerpunkt der Effektoren im Stadium der Tumorbildung sein. In

dieser Infektionsphase ist davon auszugehen, dass *U. maydis* um eine erfolgreiche biotrophe Interaktion in allen kolonisierten Organen aufrechtzuerhalten, organ- und/oder zelltypspezifische Signalwege der Immunantwort unterdrückt. Darüber hinaus manipuliert *U. maydis* den Wirtsmetabolismus sowie die Regulation des Zellzyklus der unterschiedlichen Organe bzw. Zellen zu seinen Gunsten. Dies ermöglicht dem biotrophen Phytopathogen eine individuelle Anpassung an physiologische, sowie strukturelle Gegebenheiten der einzelnen Pflanzenorgane und eine flexibel Reaktion auf organ- bzw. zelltypspezifische Abwehrmechanismen. Organspezifische Effektoren übernehmen dabei im Stadium der Tumorinduktion das „Feintuning“ in den kolonisierten Organen, nachdem basale Virulenzfaktoren die pflanzliche Immunantwort während der Penetration und Kolonisierung des Pflanzengewebes erfolgreich unterdrückt haben.

Beispiele für solche in früheren Infektionsstadien aktive basale Effektoren sind Pep1 und Pit2. Die Deletionsmutanten dieser beiden Effektoren zeigen einen sehr unterschiedlicher Phänotyp, da diese bereits vor der Tumorinduktion vom pflanzlichen Immunsystem erkannt und blockiert werden (Doehlemann *et al.*, 2011, Doehlemann *et al.*, 2009). Pep1 und Pit2 unterdrücken als Peroxidase- (Pep1) bzw. Cysteinproteaseinhibitoren (Pit2) zentrale Komponenten des pflanzlichen Immunsystems, was für die Herstellung und Erhaltung einer erfolgreichen biotrophen Interaktion essentiell ist (Hemetsberger *et al.*, 2012, Mueller *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu den organspezifischen Effektoren wird die Mutante von *pep1* bereits im Stadium der Pflanzenpenetration durch einen hypersensitive Immunantwort, also einen programmierten Zelltod, in dem befallenen Gewebe blockiert (Doehlemann *et al.*, 2009, Hemetsberger *et al.*, 2012). Die Mutante von *pit2* ist in der Lage frühe Abwehrmechanismen im Mesophyll der Pflanze zu unterdrücken, in tiefer liegenden Gewebsschichten wird diese jedoch ebenfalls durch Zelltod an der weiteren Kolonisierung gehindert (Doehlemann *et al.*, 2011). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Pflanze auf unterschiedliche Infektionsstadien eines Pathogens mit gewebes- bzw. organspezifischen Abwehrmechanismen reagiert. In *Arabidopsis thaliana* konnten diesbezüglich bereits unterschiedliche Resistenzmechanismen zwischen Epidermis und Mesophyll gezeigt werden (Lipka *et al.*, 2005). Organspezifischen Virulenzunterschiede wurden darüber hinaus bereits bei der

Interaktion zwischen dem obligat biotrophen Oomycet *Hyaloperonospora parasitica* und dessen Wirtspflanze *A. thaliana* beobachtet. Hierbei kommt es spezifisch zu Krankheitssymptomen an der Blattunterseite. Arbeiten mit anfälligen und resistenten *A. thaliana* Linien zeigten, dass das Wurzelgewebe aller getesteten *A. thaliana* Linien von *H. parasitica* kolonisiert werden konnte, während es in Blättern je nach kompatibler oder inkompatibler Pflanzen-Pathogen-Interaktion zur Suszeptibilität oder zu einer hypersensitiven Immunantwort kam. Diese Beobachtung wurde durch eine mögliche organspezifische Expression von Resistenzgenen oder Genen die für nachgeschaltete Signalkomponenten codieren erklärt (Hermanns *et al.*, 2003).

Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass die pflanzliche Immunantwort zellspezifisch reagiert. Unterschiedliche Pflanzenzellen verwenden voneinander unabhängige Signalwege, die als Abwehrreaktion zur Stomataschließung in *A. thaliana* führen. Zudem wurde herausgefunden, dass biotischer und abiotischer Stress von zwei unterschiedlichen zellspezifischen Signalwegen wahrgenommen wird (Montillet & Hirt, 2013). Hinweise für das Vorhandensein zelltypspezifischer Effektoren lieferte die Erforschung des Humanpathogens *Yersinia pseudotuberculosis*, welches sehr spezifisch Phagozyten befällt (Fahlgren *et al.*, 2009).

Evolutionär gesehen könnte die Entwicklung solcher hochspezialisierter Effektoren darauf abzielen, die Wirtsadaptation zu optimieren, was zudem zu einer engeren Wirtsspezifität führt. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass *U. maydis* lediglich Mais (*Zea mays*) sowie dessen mutmaßliche Urform Teosinte (*Zea mays* ssp. *Mexicana* und ssp. *pavigluminis*) infiziert (Christensen, 1963, Doebley, 1992), während viele andere Brandpilze in der Lage sind zwei oder noch mehr unterschiedliche Wirtsarten zu besiedeln. So können zum Beispiel *Urocystis coralloides* (Rostr) und *Urocystis brassicea* (Mund) alle Arten von Kreuzblütengewächsen infizieren. *Ustilago striiformis* (West.) Niessl. verursacht Streifenbrand bei schätzungsweise 75 unterschiedlichen Arten von Gräsern (Fischer, 1953, Holton *et al.*, 1968, Mims *et al.*, 1992).

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *U. maydis* Effektoren reflektieren unterschiedliche Stadien der Wirtsadaptation, da manche der als blattspezifisch eingeordneten Gene ebenfalls in der männlichen Blüte exprimiert werden. Allerdings hatte lediglich die Deletion des Gens *um12217* eine reduzierte

Virulenz in beiden Organen zur Folge. Eine perfekte Organspezifität zeigt *um02239*, mit einer klaren blattspezifischen Aktivität und *um05439*, mit einer ausschließlichen Expression in der männlichen Blüte, wo zudem die Mutante eine reduzierte Virulenz aufweist.

3.2 Komplementationsproblematik des Deletionstamms SG200 Δ um00154

Bei Deletion des Gens *um00154* war kein Einfluss auf das vegetative Wachstum oder die Resistenz von *U. maydis* gegenüber oxidativem- bzw. Zellwandstress zu erkennen. Die Deletionsmutante zeigte bei Maisinfektionen einen sehr interessanten organspezifischen Phänotyp, der von einer reduzierten Virulenz im Falle von Blattinfektionen bis zu einer Hypervirulenz an den männlichen Blütenständen reichte. Allerdings war es nicht möglich den beobachteten Phänotyp der Deletionsmutante durch Integration des Gens *um00154* inklusive 1 bzw. 2 kb der nativen Promotorregion in den ektopischen *ip*-Lokus der Mutante phänotypisch zu komplementieren. Das nächste benachbarte Gen (*um00153*) ist lediglich 337 bp von *um00154* entfernt, was die Vermutung aufkommen ließ, dieses eventuell unbewusst bei der Generierung des Deletionsstamms SG200 Δ um00154 beschädigt zu haben. Demzufolge wäre der beobachtete Phänotyp nicht durch die Deletion des Gens *um00154* entstanden, sondern durch eine Schädigung des Gens *um00153*, oder durch eine Kombination von beiden Ereignissen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde in den ektopischen *ip*-Lokus der Mutante SG200 Δ um00154 das Gen *um00153* inklusive 2 kb der nativen Promotor Region integriert. Blattinfektionen des resultierenden Komplementationsstamms, welcher eine einfache Integration von *um00153* enthielt, zeigten eine ähnlich reduzierte Virulenz, wie die Deletionsmutante SG200 Δ um00154. Bei einer mehrfachen Integration des Gens konnte eine stärkere Virulenz, jedoch keine vollständige Restauration des Phänotyps ermittelt werden. Eine Möglichkeit dies weiter zu analysieren wäre die Überexpression des Gens *um00153* unter Verwendung eines sehr starken Promotors oder die Erstellung und phänotypische Charakterisierung einer Deletionsmutante des Gens *um00153*. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Das Gen *um00154* wurde unter Einsatz eines sehr starken Promotors (*pit2*-Promotor) in der Mutante SG200 Δ *um00154* überexprimiert. Bei Blattinfektionen führte dies zu einer stärkeren Virulenz als die der Deletionsmutante, die Virulenz von SG200 wurde jedoch nicht erreicht.

Darüber hinaus wurde um die Expression von *Um00154* zu verhindern ein Insertionskonstrukt, sowie ein Deletionskonstrukt generiert, deren Hygromycin-Kassette durch Flippase basiertes ausschneiden entfernt wurde. Erstaunlicherweise konnte bei Blattinfektionen mit diesen beiden Stämmen keine reduzierte Virulenz mehr beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Integration der Hygromycin-Kassette in dem bearbeiteten genomischen Bereich die Expression der dort lokalisierten Gene beeinflusst. Der zu Beginn beobachtete Phänotyp wäre demnach eine Folge dieses epigenetischen Effekts. Um herauszufinden ob und wenn ja welche der Gene einen Expressionsdefekt aufweisen, müsste die Expression dieser Gene in Blättern infiziert mit der Deletionsmutante SG200 Δ *um00154* durch *qRT-PCR* ermittelt werden. Gene mit einer signifikant reduzierten Expression im Vergleich zu Wildtypinfektionen, sowie zu Infektionen mit der Deletionsmutante ohne Hygromycin-Kassette und zu Infektionen mit dem Insertionsstamm, wären interessante Kandidaten für die Generierung von Deletionsmutanten. Stämme mit Einzel- sowie Mehrfachdeletionen dieser Gene könnten anschließend in Mais infiziert werden um ihre Pathogenität zu ermitteln. Zuvor müsste natürlich ausgeschlossen werden, dass die vorgenommenen Deletionen keinen negativen Einfluss auf das vegetative Wachstum oder die Resistenz von *U. maydis* gegenüber oxidativem- bzw. Zellwandstress haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der Gene *um00154* und *um00153* in Maisblättern, infiziert mit den Stämmen SG200, SG200 Δ *um00154*, SG200 Δ *um00154-um00154*(EI, 2kb), SG200 Δ *um00154*(+FRT), sowie mit dem Insertions- und dem Überexpressionstamm bereits genauer analysiert. Das Gen *um00154* war wie gewünscht in den generierten Mutationsstämmen SG200 Δ *um00154*, SG200 Δ *um00154*(+FRT) und in dem Insertionsstamm nicht exprimiert. Die Expression des Gens konnte jedoch durch eine Integration in den *ip*-Lokus nicht wieder auf das Wildtyplevel angepasst werden. Zudem war die Expression des Gens *um00153* in dem Deletionsstamm SG200 Δ *um00154* sowie in den Komplementationsstämmen SG200 Δ *um00154-um00154*(EI, 2kb) und

SG200 Δ um00154-um00154 (MI, 2kb) ebenfalls stark reduziert, verglichen mit der des Wildtyps. In dem Insertionsstamm sowie in der Deletionsmutante SG200 Δ um00154(+FRT) war für *um00153* eine mit dem Wildtyp SG200 vergleichbare Expression zu beobachten. Somit wäre *um00153* der erste potenzielle Kandidat für eine weitere Bearbeitung.

Interessanterweise zeigten basierend auf den bereits publizierten Daten der Transkriptionsanalyse von Skibbe *et al.* 2010, sieben der 16 benachbarten Gene von *um00154* (diese liegen innerhalb einer Region von ca. 20 kbp von *um00154* entfernt) eine signifikant höhere Expression in der männlichen Blüte, verglichen mit der Expression in Maisblättern neun Tage nach der Infektion. Mit Ausnahme von *um00159* besitzt jedoch keines dieser benachbarten Gene ein vorhergesagtes Signalpeptid. Die codierten Proteine gelangen also demnach durch unkonventionelle Sekretionswege in die Wirtspflanze oder sie werden nicht sekretiert, was eine Funktion als Effektor ausschließen würde. Das Gen *um00159* zeigt kein organspezifisches Expressionsprofil und erfüllt daher nicht die Selektionskriterien für ein organspezifisches Kandidatengen (SignalP 4.1; Skibbe *et al.*, 2010).

3.3 See1 interagiert mit dem Zellzyklus- und Immunitätsregulator ZmSGT1

Ein weiteres organspezifisch exprimiertes Gen ist *um02239*, auch als *see1* (*seedling efficient effector 1*) bezeichnet. See1 trägt diesen Namen aufgrund seiner blattspezifischen Aktivität. Während der Infektion mit *U. maydis* wies *see1* eine signifikant höhere Expression in Maisblättern im Vergleich zu den männlichen Blütenständen auf. Die Deletionsmutante SG200 Δ see1 verursachte bei Blattinfektionen lediglich eine Bildung von sehr kleinen Tumoren. Im Gegensatz dazu war im Falle von Infektionen der männlichen Blüte eine mit dem Wildtyp SG200 vergleichbare Virulenz festzustellen. Durch Reintegration des Gens in den *ip*-Lokus von *U. maydis* konnte der beobachtete Phänotyp genetisch komplementiert werden. Die Vermutung, dass organspezifische *U. maydis* Effektoren funktionell im Stadium der Tumorbildung aktiv sind, indem sie den Wirtsmetabolismus sowie die Regulation des Zellzyklus manipulieren, wurde für See1 bereits verifiziert. Amey Redkar adaptierte eine Technik um *in vivo* DNA-Synthese mittels des Thymidin Analogs 5-Ethynyl-2-Desoxyuridin

(EdU), das während der DNA-Replikation in die zelluläre DNA eingebaut wird, zu visualisieren (Salic & Mitchison, 2008). Diese Markierungsmethode zeigte im Falle von SG200 Blattinfektionen speziell vier bis fünf Tage nach der Infektion viele Zellteilungsevents. Zu diesem Zeitpunkt hat sich der Pilz bereits im pflanzlichen Gewebe etabliert und beginnt nun aktiv Zellteilung zu induzieren, was eine Vergrößerung sowie eine erhöhte Teilung der Maiszellen zur Folge hat. Überraschenderweise wiesen Blattinfektionen mit der Deletionsmutante SG200 Δ see1 eine signifikant geringere Induktion der DNA-Synthese im pflanzlichen Gewebe auf. Diese Beobachtung zeigt einen Defekt in der Induktion der Zellteilung der Mutante, was bei Infektionen durch eine ausschließlich kleine Tumorbildung sichtbar wird (Redkar, 2014, Redkar *et al.*, 2014 (in Revision)).

In Vorarbeiten identifizierte Amey Redkar durch eine Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer normalisierten cDNA-Bank das Maishomolog SGT1 (*suppressor of G2 allele of skp1*) als Interaktionspartner von See1. Diese Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Co-Immunopräzipitation und bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) bestätigt. Die durch BiFC ermittelten Daten zeigten dass See1 sowie SGT1 im Cytoplasma und Nukleus der pflanzlichen Zelle lokalisieren. Dies konnte im Fall von See1 durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, die in Kooperation mit Bernd Zechmann (Baylor University, Center for Microscopy and Imaging, Waco, USA) gemacht wurden, bestätigt werden. Diese zeigen ein übereinstimmendes Lokalisationsprofil und zudem eine Translokation von See1 in angrenzende Nachbarzellen (Redkar, 2014, Redkar *et al.*, 2014 (in Revision)). Die ermittelte Lokalisierung von SGT1 deckt sich mit den dokumentierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Noel *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2008).

SGT1 wurde erstmals in *S. cerevisiae* als ein essentielles Zellzyklusprotein identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass es mit Skp1, einem Komponenten der in Eukaryoten konserviertem Skp1/Cullin/F-box (SCF) E3 ubiquitin Ligase, interagiert. Somit wird SGT1 in Hefe für den korrekten Übergang von der G1-Phase in die S-Phase (DNA-Synthese) sowie für den Übergang von der G2-Phase in die M-Phase (Zellteilung) des Zellzyklus benötigt (Kitagawa *et al.*, 1999). Mutationsanalysen in *A. thaliana* und *Gene Silencing* Experimente in *H. vulgare* sowie *N. benthamiana* belegen bereits eine Beteiligung von SGT1 an

der durch Resistenzproteine vermittelten Pflanzenabwehr (Austin *et al.*, 2002, Azevedo *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2002, Peart *et al.*, 2002, Tor *et al.*, 2002). Hier übernimmt es eine wichtige Rolle in der Bildung von Co-Chaperon-Komplexen, in die auch das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) involviert ist. Diese Komplexbildung ist für die richtige Faltung und für die Erhaltung von Erkennungskomponenten der NLR (*Nod-Like-Rezeptor*)-Rezeptoren notwendig, welche eine sensorische Funktion in der basalen Immunantwort übernehmen (Shirasu, 2009). SGT1 besitzt drei beschriebene funktionelle Domänen, die TPR- (*tetratricopeptide repeat*), CS- (*CHORD*-SGT1) und SGS- (SGT1 spezifisch) Domäne (Kitagawa *et al.*, 1999, Peart *et al.*, 2002).

Um herauszufinden, welche Bereiche der beiden Proteine See1 und SGT1 für die Interaktion verantwortlich sind, wurden diese in mehrere Abschnitte aufgeteilt und mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse auf ihre Interaktion miteinander getestet. Seitens See1 zeigte die gesamte Proteinsequenz die stärkste Interaktion mit allen einzelnen Regionen von SGT1. Im Fall von SGT1 wies die CS-Domäne die intensivste Interaktion auf. Die SGS-Domäne interagierte nur sehr schwach. Interessanterweise war unter Verwendung der CS+SGS-Domäne von SGT1 mit der vollen Proteinsequenz von See1 eine ähnlich schwache Interaktion zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die SGS-Region den für die Interaktion wichtigen Bereich der CS-Domäne teilweise blockiert. Die TPR-Domäne von SGT1 wurde in diese Analysen nicht weiter einbezogen, da sie in der Sequenz der isolierten Klone der Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit der normalisierten cDNA-Bank nicht vorhanden war und keine Interaktion mit der kompletten SGT1 Sequenz gezeigt werden konnte.

Bisher publizierte Daten dokumentieren ähnliche Beobachtungen. Deletionsanalysen sowie Kernspinresonanzspektroskopie deckten auf, dass die CS-Domäne von pflanzlichen (*H. vulgare* und *A. thaliana*) und humanen SGT1 für die Bindung an HSP90 essenziell ist (Lee *et al.*, 2004), wo hingegen die TPR-Domäne nicht benötigt wird (Boter *et al.*, 2007, Shirasu, 2009, Takahashi *et al.*, 2003). Für die SGS-Domäne von SGT1 wurde herausgefunden, dass diese alleine oder in Kombination mit der CS-Domäne in der Lage ist mit Proteinen welche eine LRR (*Leucine-Rich Repeat*)-Domänen enthalten zu interagieren. Beispiele dafür sind Bs2 von *N. benthamiana*, MLA1 *H. vulgare* oder die humanen Proteine Nod1 und NALP3 (Bieri *et al.*, 2004, da

Silva Correia *et al.*, 2007, Dubacq *et al.*, 2002, Leister *et al.*, 2005, Mayor *et al.*, 2007, Shirasu, 2009). Demnach kann vermutet werden, dass SGT1 eventuell in der Lage ist gleichzeitig über seine CS und/oder SGS-Domäne mit HSP90 und LRR-Domänen enthaltene Proteinen zu interagieren (da Silva Correia *et al.*, 2007, Mayor *et al.*, 2007).

In den letzten Jahren wurde der SGT1/HSP90 enthaltende Chaperonkomplex als Wirkungsziel mehrerer bakterieller Effektorproteine identifiziert. Zum Beispiel konnte für den Effektor AvrB von *Pseudomonas syringe* eine schwache Interaktion mit AtSGT1b festgestellt werden (Cui *et al.*, 2010). Der Effektor AvrPtoB von *P. syringe* interagiert unter anderem mit NbSGT1 um das pflanzliche Immunsystem zu unterdrücken (Hann & Rathjen, 2007). Kürzlich war es möglich eine Interaktion von *Xanthomonas campestris* und *Salmonella enterica* Effektoren mit SGT1 nachzuweisen. Der Effektor AvrBsT von *X. campestris* interagiert sehr stark mit der CS-Domäne von CaSGT1 (Kim *et al.*, 2014). Für die Interaktion mit dem Effektor SspH2 von *S. enterica* ist die CS- sowie SGS-Domäne von humanem SGT1 essentiell (Bhavsar *et al.*, 2013).

Um die beobachtete Wirkung auf die Regulierung des Zellzyklus von See1 mit dem durch die Interaktion mit SGT1 erhaltenen Einfluss auf die pflanzliche Immunantwort zu verknüpfen, liefert Bao *et al.*, 2013 erste Denkanstöße. Demnach verursacht eine Änderung in der Regulation des Zellzyklus eine erhöhte Expression von pflanzlichen Resistenzproteinen. Während organspezifische Effektoren wie See1 den Zellzyklus in den jeweiligen Geweben zugunsten der Tumorbildung manipulieren, müssten somit gleichzeitig Signalwege der pflanzlichen Abwehr unterdrückt werden. Diesbezüglich würde eine Kombination von unterdrückter Immunantwort und Umverteilung von Nährstoffen zu einer unkontrollierten Zellwucherung also zu Tumoren führen. Um dies vollständig verstehen zu können, ist es jedoch notwendig mehr über die beteiligten molekularen Mechanismen zu erfahren. Bezogen auf die Interaktion von See1 und SGT1 wurde damit bereits begonnen. Kürzlich wurde herausgefunden, dass die Aktivität von SGT1 als Signalmolekül, von einer vorgeschalteten Phosphorylierung durch eine SIPK (*salicylic acid-induced protein kinase*) Map-Kinase (*mitogen-activated protein-kinase*) abhängt (Hoser *et al.*, 2013). Die SIPK Map-Kinase wird durch Salizylsäure induziert und deren Phosphorylierung von SGT1 ermöglicht

dessen nukleare Lokalisation, wodurch mit der pflanzlichen Abwehr verbundene Signalwege aktiviert werden. Es konnte beobachtet werden, dass See1 in der Lage ist diese Phosphorylierung zu blockieren und somit eine pflanzliche Immunantwort unterdrückt (Redkar, 2014, Redkar *et al.* 2014 (in Revision)).

3.4 Charakterisierung des organspezifischen Effektors Um01829

3.4.1 Um01829 wird während der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* organspezifisch induziert und sekretiert

Die Expressionsanalyse von Um01829 mittels *qRT-PCR* zeigte eine organspezifische Induktion während der biotrophen Wachstumsphase von *U. maydis* und bestätigte somit die Ergebnisse von Skibbe *et al.*, 2010. Die höchste Expression war acht Tage nach der Infektion in Maisblättern zu beobachten.

SignalP 4.1 prognostiziert für Um01829 ein Sekretionssignal (AS: 1-18). Mittels mikroskopischer Analyse von Maisblättern, infiziert mit dem Um01829-mCherry exprimierenden *U. maydis* Stamm, konnte diese vorhergesagte Sekretion visualisiert werden. Hierbei zeigte das Um01829-mCherry Fusionsprotein eine Akkumulation an Zell/Zell-Übergängen und an der Hyphenspitze, also an Bereiche an denen Proteine sekretiert werden (Bauer *et al.*, 1997). Durch NaCl-induzierte Plasmolyse wurde der apoplastische Bereich vergrößert und eine Lokalisierung von Um01829 an den Zell/Zell-Übergängen sowie im apoplastischen Zwischenraum ermittelt. Eine ähnliche Lokalisierung wurde ebenfalls bei den sekretierten *U. maydis* Effektoren Pep1, Pit2 und Tin2 beobachtet (Doehlemann *et al.*, 2009, Mueller *et al.*, 2013, Tanaka *et al.*, 2014). Für einige Glycosyl-Hydrolasen konnte bereits eine Lokalisation im Apoplasten oder an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran nachgewiesen werden (Boudart *et al.*, 2005, Fry, 2004).

3.4.2 Die Rolle von Um01829 für die Virulenz von *U. maydis*

Passend zu dem bereits erläuterten Expressionsprofil zeigten Blattinfektionen mit der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 eine signifikant reduzierte Virulenz. Im Falle von Infektionen der männlichen Blüte waren die verursachten Krankheitssymptome mit denen von SG200 Infektionen vergleichbar. Des Weiteren konnte anhand von Wachstumsversuchen in axenischer Kultur kein Einfluss von Um01829 auf Prozesse in der saprophytischen Phase, bei der Filamentbildung oder unter Stressbedingungen festgestellt werden, was ebenfalls die Expressionsdaten stützt und für eine Rolle von Um01829 ausschließlich in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* spricht. Diesbezüglich ist jedoch eine Funktion in der frühen pathogenen Phase eher unwahrscheinlich, da Um01829 keinen signifikanten Einfluss auf die Appressorienbildung und die Penetrationseffizienz von *U. maydis* aufwies. Entweder können andere *U. maydis* Proteine dessen Funktion zu diesen Zeitpunkten übernehmen, oder Um01829 ist in dieser frühen Phase funktionell nicht aktiv. Eher ist davon auszugehen, dass der funktionelle Schwerpunkt von Um01829 in einem tumorbildenden Stadium liegt und *U. maydis* unter anderem Um01829 benötigt, um sich den Gegebenheiten der Pflanzenorgane flexibel anzupassen und um auf organspezifische Abwehrmechanismen zu reagieren. Durch Reintegration von *um01829* war es möglich den Phänotyp vollständig zu komplementieren, womit der Virulenzdefekt eindeutig der Funktion von Um01829 zugewiesen werden konnte.

Mikroskopische Analysen von Maisblättern infiziert mit der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 zeigten zwei Tage nach der Infektion keinen signifikant sichtbaren Unterschied zwischen der Mutante und dem Wildtyp. Vier und acht Tage nach der Infektion war bei der Mutante jedoch ein auffällig zirkuläres Hyphenwachstum innerhalb einer Pflanzenzelle zu beobachten. Dies vermittelt den Eindruck, dass penetrierende Hyphen der Mutante mehrere Versuche im Vergleich zu Hyphen des Wildtyps benötigen um letztendlich eine benachbarte Zelle erfolgreich zu penetrieren. Um das beobachtete zirkuläre Wachstum der Mutante mit dieser Hypothese zu verbinden, ist davon auszugehen, dass die Hyphe nach einer erfolglosen Penetration in der Zelle in eine andere Richtung weiterwächst um an andere Stelle erneut eine Penetration zu starten. Die

Zeitpunkte an denen dieser Defekt festgestellt wurde, stimmen mit dem ermittelten Expressionsprofil von *um01829* überein. Dies wies zwei Tage nach der Infektion eine sehr geringe Expression von *um01829* auf und vier bzw. acht Tage nach der Infektion eine zweifach so hohe bzw. vierfach so hohe Induktion. Es ist bereits bekannt, dass *U. maydis* um die pflanzliche Cuticula zu penetrieren nicht melanisierte Appressorien bildet und sehr wahrscheinlich zellwanddegradierenden Enzymen (CWDEs) sekretiert (Schirawski *et al.*, 2005). Diese Hypothese wird durch eine vor kurzem publizierte Transkriptionsanalyse von Lanver *et al.*, 2014 gestärkt, da hier eine hohe Expression von zellwanddegradierenden Enzymen (z.B. Xylanasen, α -L-Arabinofuranosidasen) in der frühen pathogenen Phase von *U. maydis* gezeigt werden konnte. In diesem Ansatz wurde beobachtet, dass *um01829* (hier benannt als *afg1*) während der Appressorienbildung stark induziert wird. Für die Einzeldelation von *afg1* konnte jedoch gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit keine reduzierte Virulenz bei Blattinfektionen beobachtet werden. Lediglich eine Dreifachmutante in der neben *afg1* zwei weitere für potenzielle α -L-Arabinofuranosidasen codierende Gene (*um00873*, *um03409*) deletiert wurden, zeigte eine reduzierte Virulenz bei Blattinfektionen. Der Virulenzdefekt dieser Dreifachmutante konnte jedoch durch Reintegration von *afg1* partiell komplementiert werden, was wiederum belegt, dass *afg1* einen Einfluss auf die *U. maydis* Virulenz bei Blattinfektionen hat (Lanver *et al.*, 2014).

Darauf aufbauend wäre es denkbar, dass *U. maydis* nicht nur in der frühen Penetrationsphase sondern auch zu späteren Infektionsstadien CWDEs sekretiert um durch Zell/Zell-Penetrationen das Wirtsgewebe effizient zu kolonisieren. Solch eine stadienspezifische Expression von Effektoren wurde bereits für den hemibiotrophen Pilz *Colletotrichum higginsianum* während der Kolonisierung von *A. thaliana* beschrieben (Kleemann *et al.*, 2012). Eine stadienspezifische Expression von CWDEs konnte für die Interaktion von *Fusarium graminearum* mit Weizen gezeigt werden. Zhang *et al.*, 2012 gehen diesbezüglich von einer zweiphasigen Akkumulation von CWDEs aus. Wobei die CWDEs der ersten Phase primär auf die Degradierung des Hauptgerüsts der Zellwandbestandteile abzielen und die der zweiten Phase in erster Linie die Seitenketten der Zellwandkomponenten degradieren (Zhang *et al.*, 2012).

3.4.3 Um01829 ist eine α -L-Arabinofuranosidase

Das Programm SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) sagt für Um01829 eine Funktion als α -L-Arabinofuranosidase voraus, was im Rahmen dieser Arbeit unter Einsatz synthetischer und natürlicher Substrate belegt wurde. Zusätzlich wurden durch Einbringen von Punktmutationen die Aminosäuren 410-412 (GNE) und 499 (E) als essentielle Bereiche für die enzymatische Funktion von Um01829 identifiziert.

Unter den getesteten Bedingungen war Um01829 in der Lage Azurin gefärbtes Weizenxylan und 4-Nitrophenyl α -L-Arabinofuranoside zu hydrolysieren. Dagegen konnte unter Verwendung der Substrate 4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside, 4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside und 4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside keine enzymatische Aktivität von Um01829 detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass Um01829 eine enzymatische Spezifität für die Abspaltung von Arabinoseseitenketten besitzt, da unter Einsatz anderer ebenfalls in der pflanzlichen Zellwand anwesender Zucker (Glucopyranose, Galactopyranose) keine Aktivität beobachtet werden konnte. Das lineare Xylan-Hauptgerüst, welches (1 \rightarrow 4)-verknüpfte β -D-Xylopyranosyl-Reste beinhaltet kann nicht von Um01829 hydrolysiert werden.

Inwiefern die enzymatische Aktivität des Proteins Um01829 in Zusammenhang mit der Virulenz von *U. maydis* steht, sollte durch Infektionstest mit den in Abschnitt 2.5.5 erläuterten und im oberen Absatz bereits erwähnten enzymatisch inaktiven Versionen von Um01829 herausgefunden werden. Dafür wurden Maisblätter mit den entsprechenden *U. maydis* Stämmen infiziert und 12 Tage nach der Infektion bonitiert, um ihre Komplementationsfähigkeit zu ermitteln. Die Stämme mit enzymatisch inaktiven Um01829 zeigten eine schwache phänotypische Komplementation. Es konnten alle Formen von Krankheitssymptomen die auch bei Wildtypinfektionen auftreten beobachtet werden. Die Anzahl der Pflanzen die große Tumore aufwiesen oder unter einer sehr ausgeprägten Tumorbildung litten war jedoch deutlich geringer. Die enzymatische Inaktivität von Um01829 führte somit zu einem partiellen Virulenzdefekt (der schwächer war als der der Deletionsmutante SG200 Δ Um01829). Daraus kann geschlossen werden, dass die enzymatische Aktivität als α -L-Arabinofuranosidase von Um01829 Relevanz für die Virulenz

von *U. maydis* hat. Desweiteren scheint das Protein jedoch noch eine weiter bislang unverstandenen Funktion während der Infektion zu haben. Die Durchführung einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer normalisierten cDNA-Bank von infiziertem Pflanzenmaterial könnte bei der Identifizierung möglicher Interaktionspartner von Um01829 helfen. Zudem könnten Microarray-Analysen bei der Ermittlung von Unterschieden im Transkriptom, Metabolom und Sekretom zwischen Wildtyp und der Mutante hilfreich sein. Diese beiden Ansätze liefern möglicherweise Hinweise auf weiter virulenzrelevante Funktionen von Um01829.

Für Xylanasen der nekrotrophen Pilze *Trichoderma reesei* (Xylanase II) und *Trichoderma viride* (EIX) konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass diese eine Xylan degradierende Aktivität sowie eine Funktion als Elicitor der pflanzlichen Immunantwort in *Nicotiana tabacum* und *Solanum lycopersicum* besitzen. Um aufzuklären ob die Induktion des pflanzlichen Immunsystems durch Produkte der enzymatischen Aktivität, also zum Beispiel durch Zellwandfragmente ausgelöst wird, oder ob Xylanasen direkt mit pflanzlichen Abwehrmechanismen interagieren, wurden enzymatisch inaktive Versionen der beiden Proteine erstellt. Mehrere dieser Mutanten waren trotz ihrer enzymatischen Inaktivität in der Lage die Biosynthese des in die Pflanzenabwehr involvierten Phytohormons Ethylen zu induzieren und eine hypersensitive Immunantwort auszulösen. Diese Daten belegen, dass die Xylanase Aktivität von Xylanase II und EIX und deren Funktion als Elicitor zwei voneinander unabhängige Proteinfunktionen sind (Enkerli *et al.*, 1999, Furman-Matarasso *et al.*, 1999). Für die endo- β -1,4-Xylanase Xyn11A des nekrotrophen Pilzes *Botrytis cinerea* wird ebenfalls vermutet, dass diese neben ihrer enzymatischen Aktivität eine Funktion als Elicitor besitzt und an der Induktion einer hypersensitiven Immunantwort, also programmierten Zelltod beteiligt ist (Brito *et al.*, 2006).

Wie bereits erwähnt, können neben CWDEs auch deren Degradierungsprodukte als DAMPs von dem pflanzlichen Immunsystem erkannt werden, was eine hypersensitive Immunantwort zur Folge hat (Ryan, 1987, Fry, 1993, Shibuya und Minami *et al.*, 2001). Um dies zu Umgehen sekretieren biotrophe Phylobakterien der Gattung *Xanthomonas* neben der virulenzrelevanten Xylanase XynB die Exooligoxylanase XynA. XynB besitzt eine Schlüsselfunktion in der Xylandegradierung und trägt somit dazu bei, die

pflanzliche Zellwand zu durchbrechen, liefert Nährstoffe und erleichtert die Translokation von Effektormolekülen. Während XynA, die als Elicitor wirkenden Xylooligosaccharide, die durch die enzymatische Aktivität von XynB entstehen degradiert und somit eine Oligosaccharid-induzierte Immunantwort unterdrückt (Rajeshwari *et al.*, 2005, Santos *et al.*, 2014). Bezüglich der Funktion von Um01829 wäre es somit denkbar, dass dessen enzymatische Aktivität ebenfalls darauf abzielt, die als Elicitor agierenden Zellwandfragmente abzubauen, um eine DAMP-induzierte Immunantwort zu unterdrücken. Der beobachtete partielle Einfluss der enzymatischen Aktivität von Um01829 auf die Virulenz von *U. maydis* könnte in diesem Zusammenhang dadurch erklärt werden, dass evtl. andere Glycosyl-Hydrolasen die enzymatische Funktion von Um01829 teilweise übernehmen können.

Basieren auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann über den genauen Grund des organspezifischen Phänotyps der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 nur spekuliert werden. Die Erkenntnis, dass Arabinoxylankonzentrationen sowie -kompositionen zwischen Pflanzen und deren Organen variiert, (Aspinall, 1980, Pastell *et al.*, 2009, Vazquez *et al.*, 2000) liefert einen ersten Hinweis, dass Um01829 eventuell nur oder primär in den Blättern enzymatisch als α -L-Arabinofuranosidase aktiv ist. Diese Annahme setzt jedoch voraus, dass die enzymatische Aktivität von Um01829 auch gleichzeitig ein relevanter Virulenzfaktor ist, was im Rahmen dieser Arbeit partiell belegt werden konnte. Zudem fehlen Kenntnisse über Xylangehalt und -struktur in Maisblättern sowie in den männlichen Blütenständen, um diese Hypothese zu belegen. Immunolokalisations-Experimente mit Antikörpern welche speziell an Arabinoxylane binden wären an dieser Stelle sehr hilfreich, um eine organ- bzw. zelltypspezifische Veränderung in infiziertem Pflanzenmaterial zu visualisieren.

3.5 Ausblick

Im Rahmen der hier durchgeführten funktionellen Untersuchungen des organspezifischen *U. maydis* Effektors Um01829 konnte dessen Sekretion und die anschließende Lokalisierung des Proteins an Zell/Zell-Übergängen sowie im apoplastischen Zwischenraum nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte die Deletionsmutante einen Defekt in der Zell/Zell-Penetration bei Maisblättern. Die Funktion von Um01829 als α -L-Arabinofuranosidase konnte *in vitro* belegt werden. Blattinfektionen mit enzymatisch inaktivem Um01829 sprachen der α -L-Arabinofuranosidase Funktion von Um01829 einen partiellen Einfluss auf die organspezifische Virulenz von *U. maydis* zu, was darüber hinaus auf weitere bisher noch nicht bekannte virulenzrelevante Funktionen des Effektors schließen lässt. Zukünftigen Analysen könnten darauf abzielen, diese Funktionen aufzuklären. Zudem wäre es wichtig eine Verbindung zwischen den ermittelten Funktionen und dem organspezifischen Phänotyp der Deletionsmutante herzustellen.

Die Durchführung einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer normalisierten cDNA-Bank von infiziertem Pflanzenmaterial könnte bei der Identifizierung möglicher Interaktionspartner von Um01829 helfen und somit Hinweise für zusätzliche Funktionen des Effektors geben. Diesbezüglich könnten zusätzlich transkriptionelle sowie metabolische Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutante durch *Microarray*-Analysen detektieren werden, welche ebenfalls Anhaltspunkte für weitere Funktionen von Um01829 sein können.

Darüber hinaus wäre eine Quantifizierung der Zell/Zell-Penetration in Maisblättern, infiziert mit *U. maydis* Stämmen mit enzymatisch inaktiven Um01829 hilfreich, um den ermittelten Defekt in der Zell/Zell-Penetration in Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität von Um01829 zu bringen oder um einen Zusammenhang der beiden Beobachtungen auszuschließen.

Um die bereits identifizierte Funktion als α -L-Arabinofuranosidase mit dem organspezifischen Phänotyp der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 zu verbinden, wäre es notwendig, den Arabinoxylangehalt in Maisblättern und männlichen Blütenständen zu bestimmen, sowie strukturelle Unterschiede in den Arabinoxylanen der beiden Organe aufzuklären. Immunlokalisations-Experimente mit Antikörpern welche speziell an Arabinoxylane binden wären an

dieser Stelle eine geeignete Methode, um eine organ- bzw. zelltypspezifische Veränderung in infiziertem Pflanzenmaterial zu visualisieren. Auch hier könnte die Durchführung eines Mikroarrays nützlich sein, um Unterschiede in der Xylansynthese sowie in der -degradierung in verschiedenen Pflanzenorganen infiziert mit dem Wildtyp SG200, der Deletionsmutante SG200 Δ um01829, sowie in nicht infizierten Organen der Pflanze aufzudecken.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

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

4.1.2 Puffer und Lösungen

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

4.1.3 Enzyme und Antikörper

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen. Als DNA-Polymerasen wurden Phusion[®] Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/Thermo Scientific, Bonn), oder der, Taq-Polymerase enthaltende RedMix (Bioline, Luckenwalde) 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 Tabelle 7.

4.1.4 Verwendete Kits und sonstige Materialien

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten, sowie zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das Wizard[®] SV Gel und PCR *Clean-Up System* von Promega (Mannheim) verwendet. Die Aufreinigung von Plasmiden wurde mit dem QIAprep[®] Mini Plasmid Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. 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) verwendet. Spezielle Kits sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Als Größenstandards zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 kb Marker und 100 bp Marker von NEB (Frankfurt/Main) verwendet (Abb. 28 A, B). Zur Abschätzung der Größe von Proteinen bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde der Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas/Thermo Scientific (Bonn) verwendet (Abb. 28 C). Weitere verwendete spezielle Materialien sind unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

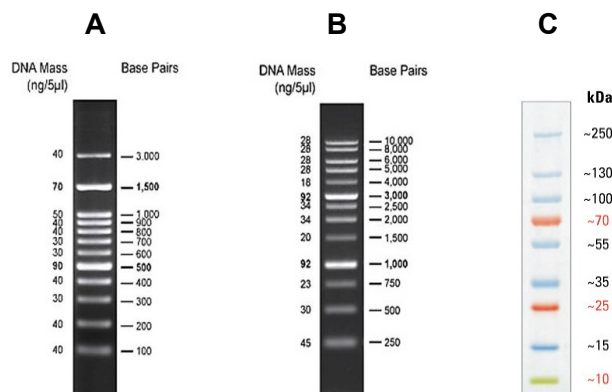


Abbildung 28: DNA- und Protein-Größenstandards

In dieser Arbeit verwendete DNA-Größenstandards: 100 bp Marker (**A**; NEB), 1 kb Marker (**B**; NEB) und Plus Prestained Protein Marker (**C**; Fermentas/Thermo Scientific).

4.2 Zellkultivierung

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

E. coli sowie *A. tumefaciens* Stämme wurden in dYT-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (*A. tumefaciens*) und 200 U/min kultiviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte falls notwendig in den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

Tabelle 4: Für Bakterienkulturen verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [µg/ml]
Ampicillin (Amp)	100
Chloramphenicol (CIm)	34
Gentamycin (Gen)	40
Kanamycin (Kan)	50
Rifampicin (Rif)	50
Streptomycin (Strp)	100
Tetrazyklin (Tet)	2,5

dYT-Flüssigmedium: 1,6 % (w/v) Trypton-Pepton
1,0 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
in H₂O_{bid.}

YT- Festmedium: 0,8 % (w/v) Trypton-Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
1,3 % (w/v) Agar
in H₂O_{bid.}

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

Die in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Kulturen wurden standardmäßig in YEPS_{light}-Flüssigmedium (modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988) bei 28°C und 200 U/min inkubiert. Für Festmedien wurde Potato-Dextrose-Agar, ggf. mit entsprechenden Antibiotikazusätzen (siehe Tab. 5), verwendet. Die dauerhafte Lagerung von *U. maydis* Kulturen erfolgte bei -80°C unter Zugabe von 50% NSY-Glycerin zu einer dicht gewachsenen ÜN (Über Nacht)-Kultur.

Tabelle 5: Für die Kultivierung von *U. maydis* Stämmen verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Carboxin (Cbx)	2
Hygromycin (Hyg)	200
Phleomycin (Phleo)	5

YEPS _{light} -Flüssigmedium:	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) Potato-Dextrose Broth 2 % (w/v) Bacto Agar in H ₂ O _{bid.}
PD-Charcoal	wie PD-Vollmedium, jedoch zusätzlich 1,0 % (w/v) Aktivkohlepulver
NSY-Glycerin	0,8 % (w/v) Nutrient Broth 0,1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Saccharose 69,6 % (v/v) Glycerin in H ₂ O _{bid.}

4.2.3 Kultivierung von *U. maydis* für Wachstumstests auf Stressmedien sowie für die Überprüfung des filamentösen Wachstums

Für die Wachstumsassays wurden die entsprechenden *U. maydis* Stämme in YEPS_{light}-Flüssigmedium (modifiziert nach Tsukuda *et al.*, 1988) bei 28°C und 200 U/min bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 inkubiert, durch Zentrifugation (10min, 3000 U/min, RT) geerntet und anschließend durch Aufnahme in H₂O auf eine OD_{600nm} 1 eingestellt. 5 μl der eingestellten Kulturen wurden in Verdünnungen von 10⁰-10⁻⁴ auf Platten mit Stressmedium getropft und 2-3 Tage bei 28°C inkubiert. Folgende Medien wurden für das Assay verwendet: CM Glucose Medium (Positivkontrolle) (Holliday, 1974), CM Glucose Medium (Holliday, 1974) versetzt mit Calcofluor white (CW) (100 $\mu\text{g/ml}$), Congo Red (45 $\mu\text{g/ml}$), H₂O₂ (1 mM), NaCl (1M) und Sorbitol (1M). Die getesteten Substanzen dienten der Induktion von osmotischem Stress (Sorbitol, NaCl), Zellwandstress (Calcofluor white, Kongorot) und oxidativem Stress (H₂O₂).

Um das filamentöse Wachstum der *U. maydis* Stämme zu prüfen wurden 0,01 g/ml Aktivkohlepulver zu CM Glucose Medium gegeben.

CM Vollmedium (Holliday, 1974)	0,6 % (w/v) NH_4NO_3 1 % (w/v) Casaminsäuren 0,1 % (w/v) Heringsperma-DNA 2 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (v/v) Vitaminlösung Zugabe von 2 % (w/v) Glucose nach Autoklavieren
Vitaminlösung (Holliday, 1974)	0,1 ‰ (w/v) Thiamin 0,05 ‰ (w/v) Riboflavin 0,05 ‰ (w/v) Pyridoxin 0,2 ‰ (w/v) Kalziumpantothemat 0,05 ‰ (w/v) para-Aminobenzoesäure 0,2 ‰ (w/v) Nikotinsäure 0,2 ‰ (w/v) Cholinchlorid 1,0 ‰ (w/v) myo-Inositol sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

4.2.4 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Stämme wurden im Falle des Wildtyps (AH109) in YPDA-Flüssigmedium bei 28°C und 200 U/min inkubiert. 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.

YPDA (-Agar):	2 % (w/v) Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,003 % (w/v) Adenin-Hemisulfat (2 % (w/v) Bacto Agar) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$, pH 6,5, Zugabe von 2% (w/v) Glucose nach Autoklavieren
SD (-Agar):	0,67 % (w/v) Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren 0,06 % (w/v) Dropout Solution (-Ade, -His, -Leu, -Trp) (2 % (w/v) Bacto Agar) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$, pH 5,8, Zugabe von 2% (w/v) Glucose nach Autoklavieren

4.2.5 Kultivierung von *P. pastoris*

P. pastoris Stämmen wurde im Falle des Wildtyps (GS115) in YPD-Flüssigmedium bei 28°C und 200 U/min inkubiert. Zur Selektion transformierter *P. pastoris* Stämme wurde MD-Medium verwendet. Dauerkulturen wurden durch Zugabe von 25% (v/v) Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert.

YPD (-Agar):	2 % (w/v) Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt (2 % (w/v) Bacto Agar) in H ₂ O _{bid.} , pH 6,5, Zugabe von 2% (w/v) Glucose nach Autoklavieren
MD (-Agar):	1,34% YNB 4 x 10 ⁻⁵ % Biotin (1,5% Bacto Agar) Zugabe von 2% (w/v) Glucose nach Autoklavieren

4.2.6 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_{600nm}) bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden Kulturen durch entsprechende Verdünnungen auf Werte unter 0,8 verdünnt. Als Referenzwert wurde die OD_{600nm} des entsprechenden Kulturmediums verwendet. Bei *U. maydis* und *S. cerevisiae* entspricht eine OD_{600nm} von 1 etwa einer Zellzahl von 1-5 x 10⁷ Zellen. Bei *E. coli* und *A. tumefaciens* entspricht dieser Wert etwa 1 x 10⁹ Bakterienzellen.

4.3 Stämme, Oligonukleotide und Plasmide

4.3.1 *E. coli* Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und deren Verwendungszweck sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm (Genotyp)	Verwendungszweck	Referenz/Bezug
K-12 Top10 [F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacO</i> 74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	(Grant <i>et al.</i> , 1990)/Invitrogen (Karlsruhe)
K-12 DH5α [F ⁻ <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> Φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYAargF</i>) U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ-]	Plasmidamplifizierung/Klonierung	Novagen/Merck, (Darmstadt)

4.3.2 *A. tumefaciens* Stämme

Zur transienten Expression von Proteinen in *N. benthamiana* wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz & Schell, 1986) verwendet. Dieser besitzt eine chromosomale Rif-Resistenz und enthält das Ti-Plasmid pMP90. Dieses Plasmid trägt die für den DNA-Transfer nötigen *vir*-Gene und eine Gent-Resistenz. 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. Bei den weiterhin zur Transformation von *A. tumefaciens* verwendeten Plasmiden handelt es sich um pGreenII-Derivate (vgl. 4.3.7.4 und 4.3.7.5), die eine Kanamycin-Resistenz vermitteln.

4.3.3 *S. cerevisiae* Stämme

Als Ausgangsstamm für sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten 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 *P. pastoris* Stämme

Für die in dieser Arbeit beschriebene Proteinexpression wurde der *P. pastoris* Stamm GS115 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser Stamm ist durch eine Mutation in dem für die Histidinol Dehydrogenase (*his4*) codierenden Gen, nicht in der Lage eigenständig Histidin zu synthetisieren.

4.3.5 *U. maydis* Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Stämme sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Bei der Erstellung von Deletionsmutanten wurde soweit nicht anders erwähnt, das jeweilige Gen nach Kämper, 2004 und Brachmann *et al.*, 2004 durch eine Resistenz-Kassette ersetzt (Brachmann *et al.*, 2004, Kämper, 2004).

Bei der Erstellung des Deletionstamms SG200 Δ um00154 (mit FRT-Sequenz) wurde das Gen *um00154* durch eine mit FRT-Sequenzen flankierte Hygromycin-Kassette ersetzt (Khrunyk *et al.*, 2010). Durch Integration des selbstreplizierenden Flippase exprimierenden Plasmids pFLPexpC (Khrunyk *et al.*, 2010) wurde ein Flippase basiertes ausschneiden der Hygromycin-Kassette ermöglicht (Abb. 29 A).

Zur Generierung des Insertionsstamms SG200-Insertion-um00154 wurde die mit FRT-Sequenzen flankierte Hygromycin-Kassette (Khrunyk *et al.*, 2010) in den genomischen Bereich von *um00154* inseriert (direkt hinter das Signalpeptid von *um00154*, bp: 67). Die Hygromycin-Kassette wurde durch Flippaseexpression entfernt und es verblieb lediglich eine FRT-Sequenz in dem genomischen Bereich von *um00154*, was eine Verschiebung des Leserasters zur Folge hatte (Abb. 29 B).

Für die Integration von Genen in den *ip*-Lokus wurden Plasmide verwendet, die ein Carboxin-resistentes *ip*-Allel (*ipR*) tragen (Broomfield & Hargreaves, 1992). Diese Plasmide wurden über homologe Rekombination mit dem endogenen, Carboxin-sensitiven, *ip*-Allel (*ipS*) in das Genom von *U. maydis* eingebracht.

Alle Stämme wurden durch Southern-Analysen verifiziert. In Stämmen, die eine Insertion im *ip*-Lokus tragen, ist das entsprechende Konstrukt, wenn nicht anders vermerkt, in einfacher Kopie inseriert. Die Plasmide zur Herstellung der Stämme sind in Abschnitt 4.3.7.2 beschrieben.

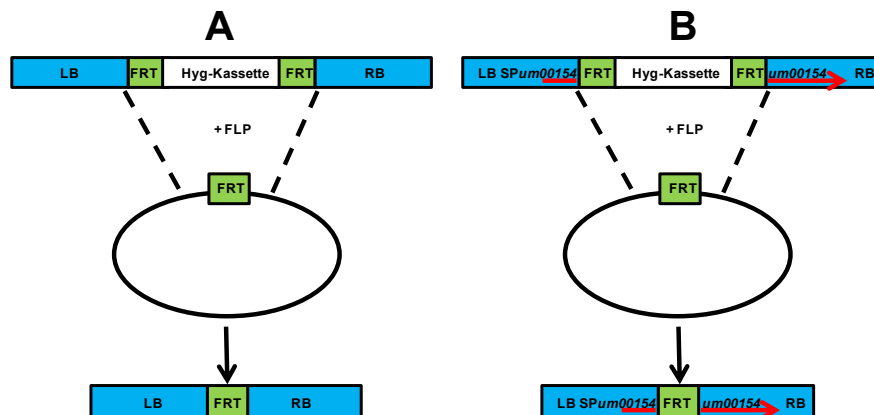


Abbildung 29: Erstellung des Deletionsstamms SG200 Δ um00154 (mit FRT-Sequenz) (A) und des Insertionsstamms SG200-Insertion-um00154 (B)

Bei der Erstellung des Deletionsstamms SG200 Δ um00154 (mit FRT-Sequenz) wurde das Gen *um00154* durch eine mit FRT-Sequenzen flankierte Hygromycin-Kassette ersetzt (Khrunyk *et al.*, 2010). Durch Integration des selbstreplizierenden Flippase exprimierenden Plasmids pFLPexpC wurde ein Flippase basiertes ausschneiden der Hygromycin-Kassette ermöglicht (Khrunyk *et al.*, 2010).

Bei der Generierung des Insertionsstamms wurde die mit FRT-Sequenzen flankierte Hygromycin-Kassette (Khrunyk *et al.*, 2010) in den genomischen Bereich von *um00154* inseriert (direkt hinter das Signalpeptid von *um00154* (bp: 67). Die Hygromycin-Kassette wurde durch Flippaseexpression entfernt und es verblieb lediglich eine FRT-Sequenz in dem genomischen Bereich von *um00154*, was eine Verschiebung des Leserasters zur Folge hatte (Khrunyk *et al.*, 2010). LB = linke Flanke, RB = rechte Flanke, FLP = Flippase, FRT = FRT-Sequenz, SP = Signalpeptid.

4.3.6 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Martinsried) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und sind in Tabelle 14 aufgeführt.

4.3.7 Plasmide

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

4.3.7.1 Plasmide zur Klonierung von PCR-Produkten

pCRII-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

Ein Plasmid zur Klonierung von PCR Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet werden.

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

pBS-hhn (Kämper, 2004)

Enthält eine 1,9 kb lange Hyg-Resistenzkassette als SfiI-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator kontrolliert. Die aus pBS-hhn gewonnene Resistenzkassette wurde standardmäßig für Einzeldelensionskonstrukte verwendet.

pHwtFRT (Khrunyk *et al.*, 2010)

Dieses Plasmid enthält ein *hph* Gen, welches von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator kontrolliert wird. *hsp70*-Promotor, *hph* Gen und *nos*-Terminator sind von FRT-Sequenzen und SfiI-Schnittstellen an beiden Enden eingegrenzt.

pFLPexpC (Khrunyk *et al.*, 2010)

Dieses Plasmid enthält das FLP-Rekombinase Gen, welches von dem *crg1*-Promoter und dem *nos*-Terminator kontrolliert wird.

pΔum00154-Hyg (diese Arbeit)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um00154*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um00154* in *U. maydis* verwendet werden.

pum00154-Hyg-Insertion (diese Arbeit)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine mit FRT-Sequenzen umschlossene Hygromycin-Resistenzkassette aus pHwtFRT (Khrunyk *et al.*, 2010) besitzt. Die linke Flanke besteht aus ca. 1,0 kb der Promotorregion von *um00154* und bp 1-

66 von *um00154*. Die rechte Flanke beinhaltet bp 76-1076 von *um00154*. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten und für die Deletion von *um00154* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum00154-Hyg mit FRT-Sequenzen (diese Arbeit)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine Hygromycin-Resistenzkassette mit FRT-Sequenzen aus pHwtFRT (Khrunyk *et al.*, 2010) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um00154*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um00154* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum01130-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um01130*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um01130* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum01690-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um01690*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um01690* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum01829-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um01829*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um01829* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum02239-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um02239*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um02239* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum03650-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um03650*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um03650* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum05223-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um05223*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um05223* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum05306-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um05306*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und XbaI geschnitten werden und für die Deletion von *um05306* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum05311-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um05311*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und XbaI geschnitten werden und für die Deletion von *um05311* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum05318-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um05318*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und XbaI geschnitten werden und für die Deletion von *um05318* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum05439-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um05439*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um05439* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum05495-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um05495*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um05495* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum06127-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um06127*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um06127* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum06222-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um06222*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um06222* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum06223-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um06223*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um06223* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum10553-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um10553*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um10553* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum11060-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um11060*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um11060* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum11763-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um11763*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und XbaI geschnitten werden und für die Deletion von *um11763* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum12217-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um12217*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um12217* in *U. maydis* verwendet werden.

pΔum12313-Hyg (Schilling *et al.*, 2014)

Ein pCRII-TOPO Derivat, das eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn (Kämper, 2004) flankierend von je 1,0 kb der 3'-Flanke bzw. der 5'-Flanke von *um12313*, enthält. Das Plasmid kann mit SpeI und EcoRV geschnitten werden und für die Deletion von *um12313* in *U. maydis* verwendet werden.

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 basierende 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-um00154(P1kb) (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200Δum00154 verwendet. Das Gen *um00154* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um00154(P2kb) (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200Δum00154 verwendet. Das Gen *um00154* mit der vorgeschalteten ca. 2 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um00153(P2kb) (diese Arbeit)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um00154 verwendet. Das Gen *um00153* mit der vorgeschalteten ca. 2 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um01690 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um01690 verwendet. Das Gen *um01690* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um01829 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um01829 verwendet. Das Gen *um01829* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx* Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um02239 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um02239 verwendet. Das Gen *um02239* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um03650 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um03650 verwendet. Das Gen *um03650* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um05306 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um05306 verwendet. Das Gen *um05306* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um05311 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um05311 verwendet. Das Gen *um05311* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um05318 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um05318 verwendet. Das Gen *um05318* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um05439 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um05439 verwendet. Das Gen *um05439* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um11060 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um11060 verwendet. Das Gen *um11060* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-um12217 (Schilling *et al.*, 2014)

Dieses Plasmid wurde für die Komplementation von SG200 Δ um12217 verwendet. Das Gen *um12217* mit der vorgeschalteten ca. 1 kb langen Promotorregion wurde amplifiziert und in den Vektor P123 inseriert, wobei sowohl der dort enthaltene *otef*-Promotor als auch das *gfp*-Gen deletiert wurden. Das Plasmid kann im *cbx*-Gen linearisiert werden und in den *ip*-Lokus inseriert werden.

p123-Ppit2-um00154 (Diese Arbeit)

Enthält das Gen *um00154* unter der Kontrolle des Promotors von *um01375* und dem *nos*-Terminator. Dieses Plasmid wurde zur Überexpression von *um00154* in SG200 Δ um00154 verwendet.

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

Dieses Plasmid enthält eine transkriptionelle Fusion des *um01779* Promotors an 3xgfp. Das Plasmid kann mit Agel linearisiert werden und in den *ip*-Lokus von *U. maydis* integriert werden.

p123-Potef-mcherry (Hergestellt von Daniela Assmann)

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

p123-um01829-mcherry (Diese Arbeit)

Dieses Plasmid enthält das Gen *um01829*, welches 3'-fusioniert an das *mCherry*-Gen, unter der Kontrolle des nativen Promotors und des *nos*-Terminators exprimiert wird. Das Plasmid kann nach Linearisierung im *cbx*-Gen in *U. maydis* durch homologe Rekombination in den *ip*-Lokus integriert werden.

4.3.7.3 Plasmide für Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen**pGBKT7** (Clontech, Mountain View, USA)

Dieses Plasmid enthält die *GAL4*-Bindedomäne gefolgt von einem Myc-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen *GAL4BDmyc*-Fusionen mit verschiedenen im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu testenden Abschnitten von See1 (Köderplasmid) verwendet. Das Plasmid vermittelt eine Kanamycin-Resistenz und enthält den *TRP1* Auxotrophiemarker.

pGBKT7-UmSee1^{AS:22-157} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit Um02239. Das dafür codierende Gen wurde ohne Signalpeptid durch die Primer OAR40 und OAR41 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGBKT7 kloniert.

pGBKT7-UmSee1^{AS:34-83(konservierte Region)} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit Um02239^{AS:34-83}. Der dafür codierende Bereich von *um02239* wurde durch die Primer OLS124 und OSL125 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGBKT7 kloniert.

pGBKT7-UmSee1^{AS:57-157 (C-Terminus)} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit Um02239^{AS:57-157}. Der dafür codierende Bereich von *um02239* wurde durch die Primer OLS126 und OAR41 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGBKT7 kloniert.

pGADT7 (Clontech, Mountain View, USA)

Dieses Plasmid enthält die *GAL4*-Aktivierungsdomäne gefolgt von einem *ha*-Epitop. Es wurde für die Herstellung von N-terminalen *GAL4AD*-HA-Fusionen mit verschiedenen im Hefe Zwei-Hybrid-System zu testenden Genen verwendet (Beutegene). Das Plasmid enthält den *LEU2* Auxotrophiemarker.

pGADT7-ZmSGT1^{full} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit AFW83327 (SGT1; Gennummer: NCBI). Das Gen wurde durch die Primer OLS130 und OLS131 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGADT7 kloniert.

pGADT7-ZmSGT1^{AS:160-240(CS-Domäne)} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit AFW83327 (SGT1; Gennummer: NCBI). Der für die AS: 160-240 codierende Bereich von *ZmSGT1* wurde durch die Primer OLS139 und OLS144 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGADT7 kloniert.

pGADT7-ZmSGT1^{AS:276-362(SGS-Domäne)} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit AFW83327 (SGT1; Gennummer: NCBI). Der für die AS: 276-362 codierende Bereich von *ZmSGT1* wurde durch die Primer OLS145 und OLS131 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGADT7 kloniert.

pGADT7-ZmSGT1^{AS:160-362(CS+SGS-Domäne)} (Diese Arbeit)

Plasmid zur Durchführung von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen mit AFW83327 (SGT1; Gennummer: NCBI). Der für die AS: 160-362 codierende Bereich von *ZmSGT1* wurde durch die Primer OLS139 und OLS131 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pGADT7 kloniert.

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

pGreenII0029 (erhalten von Christoph Hemetsberger)

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

pGreen-ZmSgt1-HA (Redkar *et al.*, 2014 (in Revision))

Plasmid, das zur transienten Expression von ZmSGT1 in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält AFW83327 (SGT1; Gennummer: NCBI) mit einem N-terminalen HA-tag. Dies wurde durch die Primer OLS149 und OLS152 amplifiziert und über XbaI und BamHI in pGreenII0029 kloniert.

pGreen-UmSee1^{AS:22-157}-Myc (Redkar *et al.*, 2014 (in Revision))

Plasmid, das zur transienten Expression von Um02239 in *N. benthamiana* verwendet wurde. Es enthält Um02239^{AS:22-157} (Um02239 ohne Signalpeptid) mit einem N-terminalen Myc-tag. Dies wurde durch die Primer OLS147 und OLS148 amplifiziert und über XbaI und SacI in pGreenII0029 kloniert.

4.3.7.5 Plasmide für die Expression der BiFC-Konstrukte in *N. benthamiana* und in epidermalen Maiszellen

pGreen-SPYCE-CFP (Hemetsberger *et al.*, 2012)

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

pSPYCE-C (Hemetsberger *et al.*, 2012)

BiFC-Kontrollvektor zur Negativkontrolle der Fluoreszenzkomplementation. Enthält *cfp* und das C-terminale *yfp*-Fragment hinter dem Legumin B4-Signalpeptid unter Kontrolle des 35S-Promoters.

pGreen-SPYCE-CFP-SGT1 (Redkar *et al.*, 2014 (in Revision))

Plasmid zur Durchführung von BiFC mit AFW83327 (SGT1; Gennummer: NCBI). Das Gen wurde durch die Primer OLS120 und OLS121 amplifiziert und über BamHI und XhoI in pGreen-SPYCE-CFP kloniert.

pGreen_SPYNE-mCherry (Hemetsberger *et al.*, 2012)

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

pSPYNE-N (Hemetsberger *et al.*, 2012)

BiFC-Kontrollvektor zur Negativkontrolle der Fluoreszenzkomplementation. Enthält *mCherry* und das N-terminale *yfp*-Fragment hinter dem Legumin B4-Signalpeptid unter Kontrolle des 35S-Promoters.

pGreen_SPYNE-mCherry-See1^{AS:22-157} (Redkar *et al.*, 2014 (in Revision))

Plasmid zur Durchführung von BiFC mit Um02239^{AS:22-157}. Das Gen wurde ohne Signalpeptid durch die Primer OLS118 und OLS119 amplifiziert und über BamHI und XhoI in pGreen_SPYNE-mCherry kloniert.

4.3.7.6 Plasmide zur Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*

pET15b (Novagen, Madison, USA)

Ausgangsplasmid für die Expression von Um01829 in *E. coli*. Das Plasmid enthält einen *T7*-Promotor und durch die 3'-Ende Fusion an eine Sequenz, welche für einen Hexahistidin-*tag* codiert, ist es möglich, die hergestellten Proteine über das Ni-NTA-System aufzureinigen.

pET15b-Um01829 (Diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Um01829 in *E. coli* zu produzieren. Es enthält *um01829* ohne Signalpeptid. Das Gen wurde mit den Primern OLS158 und OLS159 amplifiziert und über NdeI und BamHI in pET-15b kloniert.

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 das 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 codiert, was es ermöglicht, das GST-*tag* zu entfernen.

pRSET-GST-PP-Um01829 (Diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Um01829 in *E. coli* zu produzieren. Es enthält *um01829* ohne Signalpeptid. Das Gen wurde mit den Primern OLS168 und OLS169 amplifiziert und über NcoI und EcoRI in pRSET-GST-PP kloniert.

4.3.7.7 Plasmide zur Herstellung rekombinanter Proteine in *P. pastoris*

pPic9 (erhalten von Bilal Ökmen)

Ausgangsplasmid für die Expression von Um01829 in *P. pastoris*. Das Plasmid besitzt ein *his4* Gen für die Selektion von Transformanten auf Histidin defizienten Medium. Für die Expression von Proteinen in den Überstand von *P. pastoris* besitzt das Plasmid ein α -Faktor-Sekretionssignal mit einem Hexahistidin-*tag* am 3'Ende. Diese werden unter der Kontrolle des 5'AOX1-Promotors und des 3'AOX1-Terminators exprimiert.

pPic9-Um01829 (Diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Um01829 in dem Überstand von *P. pastoris* zu produzieren. Es enthält *um01829* (ohne Signalpeptid) mit einem C-terminalen Ha-tag. Dies wurde mit den Primern OLS172 und OLS173 amplifiziert und über Smal und EcoRI in pPic9 kloniert.

pPic9-Um1829^{mutAS:410-412(GNE zu AAA)} (Diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Um1829^{mutAS:410-412} in dem Überstand von *P. pastoris* zu produzieren. Es enthält *um01829* (ohne Signalpeptid) mit einem C-terminalen HA-tag. Die für Aminosäuren 410-412 (GNE) codierende Region wurde durch Punktmutation zu AAA verändert. Die mutierte Version des Gens wurde mit den Primern OLS172 und OLS173 amplifiziert und über Smal und EcoRI in pPic9 kloniert.

pPic9-Um1829^{mutAS:499(E zu A)} (Diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Um1829^{mutAS:499} in dem Überstand von *P. pastoris* zu produzieren. Es enthält *um01829* (ohne Signalpeptid) mit einem C-terminalen HA-tag. Die für die Aminosäure 499 (E) codierende Region wurde durch Punktmutation zu A verändert. Die mutierte Version des Gens wurde mit den Primern OLS172 und OLS173 amplifiziert und über Smal und EcoRI in pPic9 kloniert.

pPic9-Um1829^{mutAS:410-412+499(GNE zu AAA + E zu A)} (Diese Arbeit)

Das Plasmid wurde generiert, um Um1829^{mutAS:410-412+499} in dem Überstand von *P. pastoris* zu produzieren. Es enthält *um01829* (ohne Signalpeptid). Die für die Aminosäuren 410-412 (GNE), 499 (E) codierende Region wurde durch Punktmutation zu AAA (AS: 410-412) und A (AS: 499) verändert. Die mutierte Version des Gens wurde mit den Primern OLS172 und OLS173 amplifiziert und über Smal und EcoRI in pPic9 kloniert.

4.4 Mikrobiologische Methoden

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. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium, dem 10 mM MgCl₂ sowie 10 mM MgSO₄ zugesetzt wurden, mit 1 ml einer frischen TOP10- bzw. DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} \approx 0,5 bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Die Zellen wurden durch zentrifugieren (15 min, 3000 U/min, 4°C) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30-60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3000 U/min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 1-5 μ l Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. 1-5 μ l Ligationsansatz (siehe Abschnitt 4.5.5.2) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 sek bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz, mit 200 μ l dYT-Flüssigmedium versetzt und 30-60 min bei 800 U/min bei 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf selektiven YT-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

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

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

Die korrekte Insertion eines Konstrukts in das Plasmid pCRII-TOPO resultiert in einer Unterbrechung des *lacZ*-Gens, sodass keine funktionelle β -Galactosidase exprimiert wird, welche X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff spaltet. Kolonien, in denen Plasmide mit Insert enthalten sind, bleiben somit auf X-Gal-haltigen Platten weiß und sind so leicht von den blauen Kolonien mit Plasmid ohne Insertion des gewünschten Konstrukts zu unterscheiden. Hierfür wurden 100 μ l einer 2%igen X-Gal-Lösung ca. 1 h vor Ausplattieren des Transformationsansatzes auf die selektive YT-Platte aufgetragen.

4.4.3 Transformation von *A. tumefaciens*

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

4.4.4 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 folgendermaßen modifiziert wurde. 4 ml YEPS_{light}-Flüssigmedium wurden mit einer auf PD-Agar gewachsenen Kultur inokuliert und für 8-10 h bei 28°C und 200 U/min inkubiert. Diese Vorkultur wurde danach 1:300 in 50 ml frischem YEPS_{light}-Flüssigmedium verdünnt und bei 28°C und 200 U/min bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal $OD_{600nm} = 1,0$) geschüttelt. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugation (10min, 3000 U/min, 4°C) geerntet, einmal mit 25 ml eiskaltem SCS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 3000 U/min, 4°C) und in 2 ml SCS-Puffer mit 2,5-5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nach 10-15 min erfolgte die Zugabe von 10 ml SCS-Puffer und die Protoplasten wurden für 10 min bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit je 10 ml eiskaltem STC-Puffer gewaschen,

um Novozym-Reste vollständig zu entfernen. Danach wurde das Pellet in 0,5 ml eiskaltem STC-Puffer resuspendiert, die Protoplasten zu je 50 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit bis zu 5 µg linearisierter Plasmid-DNA (maximal 10 µl) und 1 µl Heparin-Lösung (10 mg/ml) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 µl STC/PEG-Lösung folgte ein weiterer Inkubationsschritt von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit 10 ml Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte, die das entsprechende 2x konzentrierte Antibiotikum in 10ml Bottom-Agar enthält, ausgestrichen. Nach 4-5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten vereinzelt. Resultierende Einzelkolonien wurden zur DNA-Präparation verwendet (siehe Abschnitt 4.5.2) und durch Southern-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 4.5.8) oder PCR-basierter Analyse (siehe 4.5.5.4) verifiziert.

SCS-Lösung:	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert
STC-Lösung:	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl ₂ 1 M 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 1 M Sorbitol in YEPS _{light}
Bottom-Agar:	wie Top, zusätzlich zweifach konzentriertes Antibiotikum

4.4.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte wie im *DUALmembrane starter kit manual* beschrieben. Hierzu wurden 5 ml YPD-Flüssigmedium mit einer einzelnen Kolonie von AH109 beimpft und über Nacht bei 28°C und 200 U/min

inkubiert. Ausgehend davon wurde in 50 ml 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 (5min, 2500 g, RT) geerntet und das Pellet in 2,5 ml $H_2O_{bid.}$ resuspendiert. Danach wurden 100 μ l Zellsuspension zu jeweils 300 μ l PEG-Li-Acetat-Mix, inklusive 1,5 μ g der zu transformierenden DNA, gegeben. Daraufhin erfolgte der Hitzeschock für 45 min bei 42°C, bevor die Zellen für 10 min bei 700 g abzentrifugiert und das Pellet in 100 μ l einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendiert wurde. Der vollständige Transformationsansatz wurde anschließend auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und für 3-5 Tage bei 28°C inkubiert.

PEG/LiOAc-MasterMix:	240 μ l 50% (w/v) PEG4000
	36 μ l 1M Li-Acetat
	25 μ l Single-stranded carrier DNA

4.4.6 Transformation von *P. pastoris*

Die Transformation von *P. pastoris* erfolgte mittels Elektroporation. Hierzu wurden 5 ml YPD-Flüssigmedium mit einer einzelnen Kolonie von GS115 beimpft und über Nacht bei 28°C und 200 U/min inkubiert. Ausgehend davon wurde in 250 ml YPD-Medium eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt, woraufhin eine Wachstumsphase bis zu einer maximalen OD_{600nm} von 1,5 erfolgte. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1500 g, 4°C) geerntet und das Pellet in 250 ml kaltem $H_2O_{bid.}$ resuspendiert. Die Zentrifugation wurde unter den gleichen Bedingungen wiederholt und das entstandene Pellet in 125 ml kaltem $H_2O_{bid.}$ resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen, um das Pellet diesmal in 10 ml 1 M Sorbitol zu lösen. Daraufhin wurde die Kultur erneut zentrifugiert (5 min, 1500 g, 4°C) und das Pellet in 0,5 ml 1 M Sorbitol gelöst um ein Endvolumen von 1,5 ml zu erhalten. 80 μ l der hergestellten kompetenten *P. pastoris* Zellen wurden mit 5-20 μ g linearisierter DNA (Maximalvolumen 10 μ l) gemischt und in eine gekühlte Elektroporations-Küvette (Biorad, Hercules, USA) überführt, worin die Zellen mit der linearisierten DNA für 5 min auf Eis inkubiert

wurden. Die Küvette wurde anschließend in das Gene Pulser® II Elektroporation System (Biorad, Hercules, USA) eingespannt und 1 ms einem Impuls ausgesetzt. Dabei wurden die folgenden Einstellungen verwendet: 1500 V, 25 μ F, Widerstand 400. Direkt danach wurde 1 ml gekühltes 1 M Sorbitol hinzugegeben. Der gesamte Inhalt wurde 1-2 Stunden bei 30°C ohne schütteln inkubiert und danach 500 μ l auf eine MD-Platten ausplattiert. Diese wurden ca. 4 Tage bei 28°C inkubiert. Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend durch Kolonie-PCR auf ihre Richtigkeit überprüft (siehe Abschnitt 4.5.5.4).

4.4.7 Transformation von epidermalen Maiszellen

Die Transformation von epidermalen Maiszellen wurde mittels Partikelbombardierung durchgeführt. Dafür wurden 30 mg Goldpartikel (1,6 μ M; Biorad, Hercules, USA) in 100% Ethanol resuspendiert und anschließend zentrifugiert (1min, 13300 U/min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Goldpartikel zweimal mit 1 ml sterilem $H_2O_{bid.}$ gewaschen und in 250 μ l sterilem 50%igem Glycerin resuspendiert, 20 μ l weise aliquotiert und bei -80°C gelagert. Um die Goldpartikel mit DNA zu beladen wurden 1,5 μ g Plasmid-DNA zu einem Aliquot gegeben und eine 1 min bei max. Geschwindigkeit gevortext (Vortex Genie 2, Roth, Karlsruhe). Anschließend wurden 20 μ l 2,5 M Calciumchlorid hinzugegeben und erneut für 3 min bei max. Geschwindigkeit gevortext. Daraufhin wurden 10 μ l einer sterilen 0,1 M Spermidinlösung hinzugefügt und eine weitere Minute bei max. Geschwindigkeit gevortext. Danach erfolgte eine Zugabe von 1 ml 70% Ethanol und eine weiteres Vortexen für 10 sek. bei max. Geschwindigkeit. Nun wurde das Gemisch für ca. 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die Goldpartikel sedimentieren können. Nach vollständiger Sedimentation wurde der Überstand verworfen und die Goldpartikel nochmals mit 1 ml 100% Ethanol gewaschen. Im Anschluss daran folgte wieder eine Sedimentation der Goldpartikel, der Überstand wurde wiederholt verworfen und die Goldpartikel in 40 μ l 100% Ethanol gelöst. Für die Partikelbombardierung wurde jeweils das dritte Blatt von sieben bis acht Tagen alten Maispflanzen verwendet. Ca. fünf Blätter wurden mit der Unterseite nach oben in eine mit angefeuchteten Papiertüchern ausgekleidete Petrischale

gelegt. Die Petrischale wurde ohne Deckel in dem pDS-1000/HeTM Biolistic Particle Delivery System (Biorad, Hercules, USA) platziert, 20 µl der mit DNA beladenen Goldpartikelsuspension wurden auf die Beförderungsfolie aufgetragen und einige Minuten trocknen gelassen. Eine 900 psi Reißfolie wurde wie vom Hersteller beschrieben in das System eingespannt, ein Vakuum von 3.6 kPA erzeugt und der Druck wurde bis zum zerreißen der Reißfolie gehalten, woraufhin eine sofortige Entlassung des Vakuums folgte. Die bombardierten Blätter wurden für 3 Tage in einer geschlossenen Petrischale (mit befeuchteten Papiertüchern) inkubiert und anschließend mikroskopisch analysiert (siehe Abschnitt 4.8.1).

4.4.8 Induktion von Appressorien *in vitro*

Die *in vitro* Induktion von Appressorien wurde nach Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009 mit leichten Veränderungen durchgeführt. Als Oberfläche wurde in der Regel ein Objektträger bedeckt mit Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) verwendet. Die jeweiligen Stämme wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 28°C und 200 U/min inkubiert, geerntet (5 min, 3000 U/min, RT) und in 2% YEPS_{light} (in H₂O_{bid.}) auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt. Diese Zellsuspensionen wurden mit 100 µM 16-Hydroxy-Palmitinsäure (HPS; 16-hydroxy hexadecanoic acid; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) versetzt. Dafür wurde eine 10 mM Stammlösung (in Ethanol) 1:100 mit der Zellsuspension verdünnt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend auf die Oberflächen aufgesprüht (EcoSpray; Roth, Karlsruhe). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tropfen nicht größer als 1 mm waren. Die so inokulierten Oberflächen wurden in rechteckige Petrischalen auf ein feuchtes Filterpapier platziert und die Petrischalen mit Parafilm versiegelt. Die Proben wurden in der Regel für 18 h bei 28°C inkubiert. Für die Quantifizierung der Appressorien wurden nicht adhärierende Zellen mit Wasser abgewaschen und die verbleibenden Pilzzellen mit Calcofluor white (CW) gefärbt, um Filamente sichtbar zu machen. Die Anzahl der Filamente, die eine Verdickung der Filamentspitze sowie eine Expression des Appressorien-spezifischen GFP-Reporters aufwiesen wurden mikroskopisch bestimmt und dieser Wert relativ zur Gesamtzahl der Filamente dargestellt.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 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 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur bei 13000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden zur Zellyse 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und die Proben durch mehrfaches Invertieren gemischt. Danach folgte die Zugabe von 300 µl Puffer P3, um den pH-Wert des Gemisches zu neutralisieren und die enthaltenen Proteine zu fällen, welche zusammen mit den Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min pelletiert wurden. Der klare Überstand wurde dann in einem neuen Reaktionsgefäß mit 600 µl Isopropanol (100%) gemischt, um die erhaltene Plasmid-DNA zu fällen. Anschließend wurde diese durch Zentrifugation (10min bei 13000 U/min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800 µl 75-80% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10min, 13000 U/min). Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet nach kurzem Trocknen in 50 µl H₂O_{bid.} resuspendiert.

4.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Für die Isolation genomischer DNA aus *U. maydis* wurde ein nach Hoffman & Winston, 1987 modifiziertes Protokoll verwendet. Zunächst wurden 2 ml einer *U. maydis* Übernachtskultur durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 U/min sedimentiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Zugabe von 400 µl *Ustilago*-Lysepuffer, 500 µl Phenol/Chloroform und ca. 0,2 g Glasperlen (0,4-0,6 mm; Sartorius, Göttingen), bevor die Proben für 20 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) bei 2500 U/min geschüttelt und anschließend für 15 min bei 13000 U/min zentrifugiert wurden. Danach wurde die obere Phase abgenommen, die enthaltene DNA in einem neuen Reaktionsgefäß durch Mischen mit 1 ml 100% Ethanol gefällt und für 2 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet kurz getrocknet, in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A resuspendiert und für 30

min bei 55°C und 1200 U/min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

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

4.5.3 Isolierung von *U. maydis* RNA aus axenischer Kultur

Für die Isolierung von RNA aus axenischer Kultur wurden Zellen in YEPS_{light} bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 angezogen und 30 ml dieser Kultur pelletiert (10 min 3500 U/min). Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend in 1 ml Trizol (Life Technologies GmbH, Darmstadt) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit ca. 0,3 g Glasperlen überführt. Die Proben wurden für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) geschüttelt, daraufhin mit 200 µl Chloroform gemischt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 min zentrifugiert (13.000 U/min, 4°C). Die dabei entstandene wässrige obere Phase (400-500 µl) wurde abgenommen in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt, gemischt und die RNA 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Danach folgte eine 15 minütige Zentrifugation (13300 U/min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80% Ethanol durch mehrfaches invertieren gewaschen. Im Anschluss daran wurden Ethanolreste durch zentrifugieren (7500 U/min, 10 min, 4°C) entfernt und das entstandene Pellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet um es dann in 50 µl RNase freiem H₂O bei 50°C für 10-30 min zu lösen. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Proben mit dem Turbo-DNAfree Kit (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers behandelt. Die gewonnene RNA wurde mit einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer quantifiziert.

4.5.4 Isolierungen von *U. maydis* RNA aus infizierten Maispflanzen

Es wurden sieben Tage alten Maispflanzen wie in Abschnitt 4.7.3 beschrieben mit *U. maydis* infiziert. Im Falle von Blattinfektionen wurde drei und neun Tage nach Infektion von ca. acht Pflanzen ein etwa vier cm großer Blattabschnitt unterhalb der Einstichlöcher des dritten Blattes geerntet. Bei Infektionen der männlichen Blüte wurden die männlichen Blütenstände geerntet. Das Pflanzenmaterial wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Anschließend wurde es in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Trizol (Life Technologies GmbH/Darmstadt) versetzt, durch Vortexen gemischt und bei Raumtemperatur für 5-10 min inkubiert. Daraufhin folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13300 U/min. Der Überstand wurde abgenommen, in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl Chlorophorm gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nochmals 10 min bei 13300 U/min zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol (100%) gegeben, gemischt und die RNA 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Daraufhin wurden die Proben 15 min zentrifugiert (13300 U/min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 1 ml 75% Ethanol versetzt, gemischt und 10 min zentrifugiert (13300 U/min, RT). Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet bei 55°C für 10 min getrocknet. Das Pellet wurde daraufhin in 50 µl RNase freiem H₂O gelöst. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert. Im Anschluss wurden die Proben mit dem Turbo-DNAfree Kit (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers behandelt. Die gewonnene RNA wurde mit einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer quantifiziert.

4.5.5 *In vitro* Modifikation von Nukleinsäuren

4.5.5.1 Restriktion

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

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

4.5.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem DNA Fragment verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Dabei wurden für die Ligationen jeweils 50 bis 300 ng der Vektor-DNA verwendet. Bei zwei-Fragment-Ligationen z.B. von PCR-Produkten wurde im molaren Verhältnis von 1:1 ligiert. Die Ligationen wurden in der Regel in einem Volumen von 10-20 µl angesetzt und erfolgte über Nacht bei 4°C.

4.5.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Mullis *et al.*, 1986). Je nach Anwendung wurden verschiedene Polymerasen eingesetzt. Zur Amplifizierung von DNA für Klonierungen 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 verwendet. Nachfolgend sind die verwendeten Ansätze für die einzelnen Polymerasen beschrieben. Das PCR Programm beinhaltete folgendes Schemata: Initiale Denaturierung [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen - finale Elongation. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und nach Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase variiert. Die Anlagerungstemperaturen der verwendeten Oligonukleotide wurden *in silico* mittels des Programmes Clonemanager9.0 (Sci-Ed Software, Cary, USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine T-Personal (Biometra, Jena) durchgeführt.

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

20 µl Ansatz:

ca. 20 ng Matrizen-DNA

1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5'-Strang)

1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3'-Strang)

1 x konzentrierter GC-Puffer

1,2 U Phusion-Polymerase

600 µM dNTPs (Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1)

Programm:

98°C/2min – [98°C/15sek – 60-63°C/15sek – 72°C/30sek/kb] x 30-35 – 72°C/5min

RedMix (Bioline, Luckenwalde):

20 µl Ansatz:

ca. 20 ng Matrizen-DNA

1 x konzentrierter RedMix

1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5'-Strang)

1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3'-Strang)

Programm:

98°C/2min – [98°C/15sek – 60-65°C/15sek – 72°C/60sek/kb] x 30-35 – 72°C/5min

4.5.5.4 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Um DNA-Fragmente unter Verwendung von einer Kolonie als Vorlage zu amplifizieren wurde die im RedMix (Bioline, Luckenwalde) enthaltene Taq Polymerase verwendet. Eine Kolonie wurde in 100 µl sterilem H₂O gelöst und 5 µl als Vorlage im PCR-Ansatz verwendet. Im Falle von *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurde eine Kolonie in 100 µl 20 mM NaOH gelöst, 10 min bei 99°C gekocht und 5 µl als Vorlage im PCR-Ansatz verwendet. Das PCR Programm beinhaltete folgendes Schemata: Initiale Denaturierung [Denaturierung - Anlagerung - Elongation] x Zahl der Zyklen - finale Elongation. Die Elongationszeiten wurden je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert. Die Anlagerungstemperaturen der verwendeten Oligonukleotide wurden *in silico* mittels des Programmes Clonemanager9.0 (Sci-Ed Software, Cary, USA) bestimmt. Die PCR-Reaktionen wurden in der PCR-Maschine T-Personal (Biometra, Jena) durchgeführt.

RedMix (Bioline, Luckenwalde) für Kolonie-PCR:

25 µl Ansatz:

5 µl Matrizen-DNA

1 x konzentrierter RedMix

1 µM Oligonukleotid 1 (bindet am 5'-Strang)

1 µM Oligonukleotid 2 (bindet am 3'-Strang)

Programm:

98°C/2min – [98°C/15sek – 60-65°C/15sek – 72°C/60sek/kb] x 30-35 – 72°C/5min

4.5.5.5 Ortspezifische Mutagenese von Nukleinsäuren

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

4.5.5.6 Sequenzierung von Nukleinsäuren

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

4.5.6 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

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

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

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

4.5.7 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

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

4.5.8 Southern Analyse

20 µl der isolierten genomische DNA aus *U. maydis* Transformanden (vgl. Kapitel 4.5.2) wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Enzyme wurden dabei so gewählt, dass aufgrund des eingebrachten Konstrukts die Anzahl und/oder die Größe der entstandenen Fragmente in diesem Lokus verändert waren. Die verdaute DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Endvolumen 3 M Kaliumacetat und dem 3-fachen Volumen 100% Ethanol für mindestens 30 min bei -20°C gefällt und anschließend für 15 min zentrifugiert (14000 U/min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet zunächst mit 750 µl 80% Ethanol gewaschen und dann erneut für 5 min zentrifugiert (14000 U/min, 4°C). Anschließend wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet kurz getrocknet, bevor es in 20 µl 1 x DNA-Ladepuffer resuspendiert wurde. Die verdaute DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (TAE-Gel, 1% Agarose, 80 mA) und mit einer nach Southern, 1975

modifizierten Methode auf eine Nylonmembran transferiert. Vor dem Transfer wurde das Gel für 15 min in 0,25 M HCl zur Depurinierung inkubiert. Dies ermöglichte auch den Transfer großer DNA Fragmente. Anschließend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH neutralisiert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; GE Healthcare, München) erfolgte über Kapillarkräfte, indem die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir durch das Gel hindurch in einen Stapel Papierhandtücher gesaugt wurde. Die DNA-Fragmente werden dabei durch den Flüssigkeitsstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Transfer erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 5 Stunden, wobei in diesem Fall in regelmäßigen Abständen die Papiertücher ausgetauscht wurden. Die transferierte DNA wurde sofort nach Abbau des Blottes durch *crosslinking* (Ultraviolet Crosslinker, Amersham Life Science) fixiert und die Membran zunächst in einer Hybridisierungsröhre mit ca. 20 ml Southern-Hybridisierungspuffer für 30 min - 2 h bei 65°C im Hybridisierungsofen (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 LabelingMix Kits (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben amplifiziert wurden. Die auf diese Weise hergestellten DNA-Sonden wurden vor Verwendung für 10 min bei 100°C denaturiert und dann mit 40 ml auf 65°C vorgewärmtem Southern-Hybridisierungspuffer gemischt. Der Southern-Hybridisierungspuffer in der Hybridisierungsröhre wurde anschließend durch die in Southern-Hybridisierungspuffer gelöste, Hitze-denaturierte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen. Am nächsten Morgen wurde die Membran nach Entfernen der Sonde zweimal für 15 min mit Southern-Waschpuffer bei 65°C gewaschen, alle folgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Dabei wurde die Membran einmal für 5 min in DIG-Waschpuffer und anschließend für 30 min in DIG-Puffer 2 inkubiert, welcher danach durch die Antikörperlösung ersetzt wurde, worin die Membran für weitere 30 min inkubiert wurde. Um überschüssige Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran zweimal für je 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen und daraufhin 5 min in DIG-Puffer 3 inkubiert, um den für die kovalent an den Antikörper gebundene Phosphatase optimalen pH-Wert

von 9,5 zu erreichen. Daraufhin wurde deren Substrat CDP Star (Roche, Mannheim) 1:100 in DIG-Puffer 3 verdünnt und die Membran für 5 min damit inkubiert, bevor sie in eine Plastikfolie eingeschweißt und für 15 min bei 37°C inkubiert wurde, um eine lichtproduzierende Reaktion zu aktivieren. Danach erfolgte die Exposition eines lichtsensitiven Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) je nach Intensität des Signals für 1-30 min und die Entwicklung in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60, Konica, München).

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

4.5.9 cDNA-Synthese

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

4.5.10 Quantitative *real-time PCR*

Für die quantitative *real-time PCR* (*qRT-PCR*) wurden mögliche DNA-Reste in den RNA-Proben mit Hilfe des ‘Turbo DNA-free’ Kits (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) entfernt. Die isolierte RNA wurde anschließend mit dem ‘First Strand cDNA Synthesis Kit’ (Fermentas) nach Herstellerangaben in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde für die *qRT-PCR* Reaktionen eingesetzt, welche mit Hilfe des ‘iQTMSYBR[®] Green Supermix’-Kits der Firma Bio-Rad (Dreieich) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Für die PCR Reaktionen wurden in der Regel 1-5 µl cDNA eingesetzt. Als Referenzfarbstoff wurde Fluorescein (20 nM; Bio-Rad, München) verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Bio-Rad iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms durchgeführt: 95°C/2 min – [95°C/30sek – 62°C/30sek – 72°C/30sek] x 45. Die Spezifität der Reaktionen wurde nach Beenden der PCR anhand der vom Gerät berechneten Schmelzkurve überprüft. Der ‘*Threshold Cycle*’ wurde mittels der Bio-Rad Software Version 3.0 ermittelt. Die relativen Expressionswerte wurden mit Hilfe des Programmes Gene Expression Macro (Bio-Rad, München) bzw. mit dem REST[®] *relative expression software tool* (Qiagen, Hilden) (Pfaffl *et al.*, 2002) berechnet.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 verwendet. Diese Methode ermöglicht es denaturierte Proteine nach ihrer Molekülgröße in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Um eine vollständige Denaturierung zu erhalten, werden die Proteinproben mit 1 x SDS-

Gelladepuffer versetzt mit 100 mM Dithiothreitol (DTT) für 10 min 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. Für die Auftrennung wurden vertikale Gele (10,5 x 11,5 x 0,1 cm) verwendet (Mini Protean System, BioRad, München), welche sich aus Sammel- und Trenngel zusammensetzten. Durch Einsatz entsprechender Kämme (BioRad, München) im Sammelgel wurden Taschen erzeugt, in die die vorbereiteten Proben eingefüllt wurden. Das weitporige Sammelgel 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. Mit der Höhe des Acrylamidanteils, steigt die Feinmaschigkeit des Molekularnetzes. Daher werden zur Auftrennung kleiner Proteine höherprozentige Gele verwendet und zur Auftrennung großer Proteine niedrigprozentige Gele. Als Laufpuffer in der Gelkammer wurde 1 x SDS-Laufpuffer verwendet. Die Molekülmasse von Proteinen konnte mithilfe eines vorgefärbten Proteinstandardgemisches (Prestained Protein Marker 10-170kDa, Fermentas, St. Leon-Roth) abgeschätzt werden. Ein Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 120-160 V für ca. 1 h.

6 x SDS-Gelladepuffer:	4 M Tris-HCl, pH 6,8 6 % (w/v) SDS 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 60 % (v/v) Glycerin
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 4 mM SDS
Sammelgel:	5 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05 % (v/v) Tetramethyl- ethyldiamin

Trenngel:	12-17 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 zum Starten der Polymerisation: 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,05 % (v/v) Tetramethyl- Ethylendiamin
-----------	--

4.6.2 Immunologischer Proteinnachweis durch Chemolumineszenz (Western Blot)

Die per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch ein *Semi-dry* Transfer System (BioRad, München) auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dafür wurde eine Lage 3 mm Whatman-Papier in Transfer-Puffer für 10-15 min befeuchtet und mit der Nitrocellulose-Membran bedeckt. Darauf wurde dann blasenfrei das SDS-Gel gelegt, welches zuvor ebenfalls für 10-15 min in Transfer-Puffer äquilibriert wurde und mit einem weiteren feuchten 3 mm Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 mA/Gel. Anschließend konnten die auf die Membran transferierten Proteine spezifisch detektiert werden. Die dafür verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Membran wurde vor Zugabe des primären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (3%) inkubiert. Die Inkubation mit der Antikörperlösung, welche den primären Antikörper enthielt, erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit Blockierlösung (0,5%) gewaschen und anschließend mit Blockierlösung (0,5%), welche den sekundären Antikörper enthielt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS-T-Puffer für jeweils 10 min wurde die Membran für 5 min mit ECL Plus Western Blot *detection reagent* (GE Healthcare, München) inkubiert und in einer Folie verschweißt in eine Kassette mit Verstärkerfolie gelegt. Es folgte die Exposition eines Filmes (Kodak X-Omaz XAR-5) für 1-60 min, je nach Intensität des Lichtsignals. Entwickelt wurden die Filme in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine (QX-60; Konica, München).

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

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

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verwendung	Bezugsquelle
anti-HA (aus Maus)	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von HA-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:10000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-His (aus Maus)	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von His-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:10000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-c-Myc (aus Maus)	Monoklonaler primärer Antikörper aus Maus, der zur Detektion von c-Myc-Fusionsproteinen diente (Verdünnung 1:5000).	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Maus-HRP (aus Pferd)	Sekundärer Antikörper zur Detektion von primären Antikörpern die aus Mäusen gewonnen wurden (Verdünnung 1:2500).	Cell Signaling Technology (Danver, USA)

4.6.3 Coomassie-Proteinfärbung

Um Proteine nach der Auftrennung über SDS-PAGE sichtbar zu machen wurde die Proteinfärbelösung PageBlue (Fermentas, St.Leon-Roth) nach Herstellerangaben verwendet. Die auf dem Coomassie Brilliant BlueR250 basierende Colloid-Coomassielösung ermöglicht die Detektion von Proteinen im SDS-Gel bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 5 ng. Die Entfärbung der Gele erfolgt durch Waschen in H₂O_{bid.}.

4.6.4 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.

4.6.5 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet. Informationen bezüglich der transformierten Plasmide, der daraus resultierenden Stämme, sowie die entsprechenden Induktionsbedingungen können Tabelle 8 entnommen werden. 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 200 U/min inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,2 in 200 ml dYT-Flüssigmedium, das mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, eingestellt. Die Zellen wurden nun bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 bei 37°C und 200 U/min inkubiert, bevor die Induktion der genomcodierten T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von 1 mM IPTG initiiert wurde. Da allen verwendeten Zielgenen der T7-Promoter vorgeschaltet ist, wird dadurch die Herstellung der entsprechenden, Proteine gestartet. Die in Tabelle 8 angegebenen Temperaturen beziehen sich auf die getesteten Inkubationstemperaturen nach IPTG-Induktion. Nach den ebenfalls in Tabelle 8 angegebenen getesteten Inkubationszeiten wurden die Zellen bei 4°C und 6000 U/min für 30 min durch Zentrifugation geerntet und anschließend bei -20°C gelagert oder direkt weiter bearbeitet. Ein Pellet entspricht hierbei der Menge von 400 ml Kultur.

Zur Analyse der Produktion und Löslichkeit des Zielproteins wurden unter Verwendung des Plasmids pET15b-Um01829 die geernteten Zellen nach Angaben des „QIAexpressionist“ Protokolls (Protokoll 6: „Determination of target protein solubility“ Qiagen, Hilden) behandelt. Zur Zellyse von Zellen mit dem Plasmid pRSET-GST-PP-Um01829 wurden die Zellpellets in 20 ml GST-Lyse-Puffer resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Zellaufschluss wurden zwei unterschiedliche Verfahren (Sonifikation, *French*

Press) getestet. Aliquots vom Gesamtzellextrakt, der unlöslichen Zelltrümmerfraktion sowie des löslichen Proteinrohextrakts wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 99°C gekocht und mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein des Zielproteins hin analysiert.

Tabelle 8: Bedingungen zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Plasmid	Stamm	IPTG[mM]	Inkubations- temperatur [°C]	Inkubations- zeit [h]
pET15b-Um01829	BL21(DE3)pLysS- pET15b-Um01829	1	16, 28, 37	2, 4, 8, 16, 20
pRSET-GST-PP- Um01829	BL21(DE3)pLysS- pRSET-GST-PP- Um01829	1	16, 28, 37	2, 4, 8, 16, 20

GST-Lyse-Puffer

140 mM NaCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
2,7 mM KCl
0,5 mM EDTA
1 % (v/v) Triton X-100
pH 7,4

4.6.6 Proteinexpression in *P. pastoris*

Zur Produktion rekombinanter Proteine in *P. pastoris* wurde der Stamm GS115 verwendet. Informationen bezüglich der transformierten Plasmide, der daraus resultierenden Stämme, sowie die entsprechenden Induktionsbedingungen können Tabelle 9 entnommen werden.

Von dem jeweiligen *P. pastoris* Stamm wurde zunächst eine Vorkultur in BMGY-Flüssigmedium angesetzt. Diese wurde über Nacht bei 28°C und 200 U/min inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 1 in 10 x 25 ml BMGY-Flüssigmedium eingestellt (verwendeten Gefäße: 10 x 250 ml Erlenmeyer-Kolben). Die Zellen wurden nun bis zu einer OD_{600nm} von 4 bei 28°C und 200 U/min inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (5 min, 2000g, 4°C) geerntet. Für die Induktion der Proteinexpression wurde der Überstand verworfen und das Pellet in BMMY-Flüssigmedium aufgenommen, um eine OD_{600nm} von 1 zu erhalten. Nach 24 Stunden Inkubation wurde eine dem Volumen entsprechende Menge an 100%igem Methanol zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,5% Methanol in der Expressionskultur zu erhalten.

Nach 36 Stunden wurde die Kultur bei 4°C für 5 min bei 2000 g zentrifugiert und es folgte die Aufreinigung der Proteine über IMAC (siehe Kapitel 4.6.7).

Tabelle 9: Bedingungen zur heterologen Herstellung rekombinanter Proteine in *P. pastoris*

Plasmid	Stamm	Methanol[%]	Inkubations-temperatur [°C]	Inkubations-zeit [h]
pPic9-Um01829	GS115-pPic9-Um01829	0,5	28	36
pPic9-Um1829^{mutAS:410-412(GNE zu AAA)}	GS115-pPic9-Um1829 ^{mutAS:410-412(GNE zu AAA)}	0,5	28	36
pPic9-Um1829^{mutAS:499(E zu A)}	GS115-pPic9-Um1829 ^{mutAS:499(E zu A)}	0,5	28	36
pPic9-Um1829^{mutAS:410-412+499(GNE zu AAA + E zu A)}	GS115-pPic9-Um1829 ^{mutAS:410-412+499(GNE zu AAA + E zu A)}	0,5	28	36

BMGY und BMMY- Medium

1 % (w/v) Hefeextrakt
 2 % (w/v) Pepton
 Nach autoklavieren:
 100 mM Kaliumphosphat, pH 6.0
 1.34 % (v/v) YNB
 4x10⁻⁵ % (w/v) Biotin
 1 % (v/v) Glycerol (BMGY) oder
 0,5 % (v/v) Methanol (BMMY)

4.6.7 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatografie (IMAC)

Zur Affinitätsreinigung der im Überstand von *P. pastoris* exprimierten Proteine, welche mit einem Hexahistidin (His_6)-tag versehen waren, wurde eine IMAC durchgeführt. Diese basiert auf der Chelatisierung immobilisierter Ni^{2+} -Ionen auf Ni-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Säulenmaterial, durch die Imidazoliumgruppen des His_6 -tags. Nach der heterologen Expression wurde 1 Liter des Überstands in 8xBindepuffer so aufgenommen, dass sich eine Konzentration von 1xBindepuffer einstellte. Dies wurde 350 ml-weise auf Zentrifugationsgefäße aufgeteilt und zu je 350 ml Überstand 1 ml Ni-NTA-Matrix (Ni-SepharoseTM 6 Fast-Flow, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben. Anschließend wurde dies unter permanentem Rühren 2 h bei 4°C inkubiert. Darauf folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 4°C und 1000 g. Etwa 300 ml des Überstands wurde vorsichtig abgegossen und die restlichen ca. 50 ml pro Zentrifugationsgefäß wurden mit der sedimentierten Ni-NTA-Matrix nach und nach auf eine geöffnete Gravitationsdurchfluss-Säule gegeben. Es folgten fünf Waschschrte mit je 5 ml

Bindepuffer (1x) und fünf Waschschr tte mit je 5 ml Waschpuffer (1x). Die Elution der an der Ni-NTA-Matrix gebundenen Proteine erfolgte mittels Elutionspuffer (1x) in 3 Elutionsschritten zu je 2 ml. Sämtliche Durchflussfraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und jene, die reines Protein enthielten wurden in einer Dialysekassette (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 20K MWCO, 30mL, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) vereinigt und in 5 L Dialysepuffer über Nacht bei 4°C unter st ndigem R hren inkubiert. Nach den ersten 4 h Inkubation wurde der Dialysepuffer erneuert. Am nächsten Morgen wurden die dialysierten Fraktionen mittels Amicon Ultra tubes (Milipore, Tullagreen, Irland) nach Herstellerangaben konzentriert und bei -20°C gelagert.

Ni-NTA-Bindepuffer (8x)	160 mM Tris-HCl, pH 7,9 4M NaCl 160 mM Imidazol
Ni-NTA-Waschpuffer (8x)	160 mM Tris-HCl, pH 7,9 4 M NaCl 480 mM Imidazol
Ni-NTA-Elutionspuffer (4x)	80 mM Tris-HCl, pH 7,9 2 M NaCl 4 M Imidazol
Dialysepuffer	0,1 M Natriumazetat 0,02 % Natriumazid 25 % Glycerin 0,32 mM Ammoniumsulfat pH 4

4.6.8 Enzymaktivitäts-Assays mit 4-Nitrophenyl markierten Substraten

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der aufgereinigten Proteine wurden *in vitro* zeitabhängige sowie substratabhängige Kinetiken in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) durchgeführt. Im Falle einer Kinetik mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden die synthetischen Substrate 4-Nitrophenyl α -L- Arabinofuranoside, 4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside, 4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside und 4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 4) auf Konzentrationen von 0,4 mM, 0,8 mM, 1,2 mM, 1,6 mM, 2,0 mM, 2,4 mM, 2,8 mM, 3,2 mM, 3,6 mM, 4 mM, 4,4 mM und 4,8 mM eingestellt. Diese

Substrate können enzymatisch gespalten werden, wobei es zur Freisetzung von 4-Nitrophenyl kommt, was sich bei Zugabe von 2%igem Tri-Natriumphosphat-Puffer bzw. 0,2 M Natriumcarbonat-Puffer gelb färbt und dessen Absorption photometrisch bei 400 nm gemessen werden kann. Die zu testenden aufgereinigten Proteine wurden in einer Konzentration von 1,34 μM für die Messungen verwendet. Substrate und zu testende Proteine wurden für 5 min bei 40°C inkubiert und anschließend pro Reaktion 10 μl Substrat mit 10 μl Protein gemischt. Nach exakt 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl 2%-Tri-Natriumphosphat-Puffer (pH 12) bei Verwendung der Substrate 4-Nitrophenyl α -L- Arabinofuranoside und 4-Nitrophenyl β -D-Xylopyranoside gestoppt. Bei Einsatz der Substrate 4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranoside und 4-Nitrophenyl α -D-Galactopyranoside wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μl 0,2 M Natriumcarbonat-Puffer gestoppt. Die Absorption wurde bei 400 nm in einem Fluorimeter (Tecan Safire, Crailsheim) ermittelt. Die Durchführung einer zeitabhängigen Kinetik unterschied sich lediglich in der eingesetzten Substratkonzentration von 5 mM und darin, dass die Reaktion nach 1-8 sowie nach 10,12, und 14 min gestoppt wurde. Die Blindproben wurden nicht bei 40°C inkubiert, sondern direkt mit 150 μl 2%-Tri-Natriumphosphat-Puffer (pH 12) bzw. 0,2 M Natriumcarbonat-Puffer versetzt. Als Positivkontrollen dienten die kommerziell erhältlichen Enzyme α -L-Arabinofuranosidase von *Aspergillus niger*, β -Xylosidase von *Selenomonas ruminantium*, α -Glucosidase von *Bacillus stearothermophilus* und α -Galactosidase von *Aspergillus niger* (Megazyme, Irland), welche ebenfalls in einer Konzentration von 1,34 μM eingesetzt wurden.

4.6.9 Enzymaktivitäts-Assays mit Azurin gefärbtem Weizenxyylan als Substrat

Die zu testen Proteine wurden im Überstand von *P. pastoris* überexprimierten, anschließend mittels Amicon Ultra tubes (Milipore, Tullagreen, Irland) nach Herstellerangaben konzentriert und in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 4) auf eine Konzentration von 3,35 μM für das Assay eingestellt. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben (Xylozyme AX Tablets, Megazyme, Wicklow, Irland). Diesen folgend wurden je 0,5 ml der zu testen

Proben in Reagenzröhrchen gefüllt, eine Tablette *Xylazyme AX* zugegeben und bei 40°C für 2, 4, 8, 16, 32, sowie 64 min inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml 2%-Tri-Natriumphosphat-Puffer (pH 11) gestoppt, gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Daraufhin wurden die Proben nochmals gevortext und durch einen Whatman-Filter Nr.1 (9 cm) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gefiltert. Anschließend wurde die Absorption des Filtrats bei 590 nm gemessen. Die Blindprobe wurde nicht bei 40°C inkubiert, sondern stattdessen direkt mit 10ml 2%-Tri-Natriumphosphat-Puffer (pH 11) versetzt. Als Positivkontrolle diente die mitgelieferte Xylanase von *Trichoderma longibrachiatum*, welche ebenfalls in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 4) auf eine Konzentration von 3,35 µM eingestellt wurde.

4.6.10 Co-Immunopräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurden ca. acht *N. benthamiana* Blätter mit den jeweiligen *A. tumefaciens* Stämmen infiltriert (vgl. Abschnitt 4.7.7), um eine Co-expression der zu analysierenden Proteine zu erhalten. Als Expressionskontrolle wurden die zu analysierenden Proteine ebenso einzeln exprimiert. Vier Tage nach der Infiltration wurden die Blätter geerntet, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder gleich weiterbearbeitet. Die geernteten Blätter wurden darauf folgend in Flüssigstickstoff fein gemörsert und in einem Puffer bestehend aus 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl (pH 7.0) aufgenommen. Die Pflanzenextrakt wurde für 5 min zentrifugiert (3500 U/min, 4°C) und anschließend mit Hilfe eines Filteraufsatzes (Porengröße 0,2µm; Merck, Darmstadt) sterilfiltriert. Die Proteinkonzentration der Extraktes wurde mittels der Methode von Bradford (1976) (vgl. Abschnitt 4.6.4) bestimmt. Zu 1 ml Blattextrakt mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml, wurden 50 µl Anti-HA Affinity Matrix (Roche Diagnostics, Mannheim) hinzugefügt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Extrakte auf einen Pierce SpinColumns (Thermo Scientific, Rockford, USA) geladen und nach Herstellerangaben zentrifugiert (1min, 3000 U/min, RT). Daraufhin wurden die Pierce SpinColumns mit 700 µl Puffer (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl (pH

7.0)) gewaschen. Auf die Säulen des Pierce SpinColumns wurde nun 50 µl 2xSDS-Ladepuffer gegeben und diese bei 99°C für 5 min in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) gekocht. Danach wurden die Säulen auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und bei 3000 U/min zentrifugiert. In der Regel wurden anschließend 20 µl der eluierten Proteine auf ein SDS-Gel geladen (vgl. Abschnitt 4.6.1) und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (vgl. Abschnitt 4.6.2).

4.6.11 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Für die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation wurde eine nach Hemetsberger *et al.*, 2012, leicht modifizierte Methode gewählt, die einen Expressionsnachweis der beiden zu untersuchenden Proteine beinhaltet (eBiFC = *enhanced bimolecular fluorescence complemetation*). Es wird davon ausgegangen, dass nur bei einer direkten Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine die räumliche Nähe der Interaktionspartner zueinander dazu führt, dass die beiden YFP-Fragmente sich aneinander lagern und ein funktionelles Chromophor bilden (Waadt & Kudla, 2008). Bei einer Protein-Protein Interaktion sollte demnach eine YFP-Fluoreszenz in einem bestimmten Kompartiment der Pflanzenzellen mikroskopisch nachzuweisen sein. Da die N-terminale Hälfte des YFP-Chromophores in diesem Ansatz zusätzlich mit einem mCherry-Chromophor und die C-terminale Hälfte mit einem CFP-Chromophor versehen sind, stehen auch bei einer fehlenden direkten Interaktion der markierten Proteine, die Fluoreszenzsignale von CFP und mCherry zur Verfügung und erlauben die Expressionskontrolle und Lokalisierung der Proteine (Abb. 30).

Die entsprechenden eBiFC-Konstrukte wurden durch ballistische Transformation von epidermalen Maiszellen unter der Kontrolle des 35S Promotors co-exprimiert. (vgl. Abschnitt 4.4.7).

Als Negativkontrolle wurde je ein Interaktionspartner mit dem Leervektor (enthält Startcodon vor mCherry bzw. CFP) des korrelierenden eBiFC-Konstrukts co-transformiert.

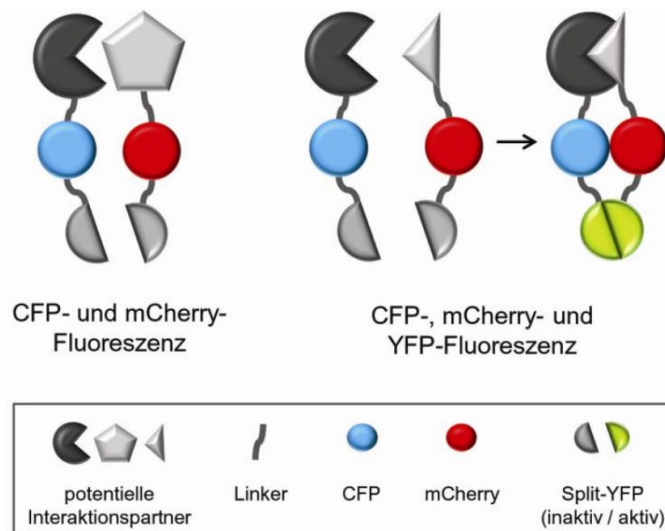


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Funktion von eBiFC

Im Falle einer direkten Interaktion zweier markierter Proteine kommen die YFP-Teile in räumliche Nähe zueinander und es erfolgt eine Fluoreszenzkomplementation, d.h. bei erfolgreicher Interaktion zweier markierter Proteine ist das Resultat eine YFP-Fluoreszenz (rechte Seite). Erfolgt keine Interaktion, so ist auch kein Fluoreszenzsignal sichtbar (linke Seite). Im Gegensatz zum einfachen BiFC stehen bei eBiFC auch bei fehlender direkter Interaktion der markierten Proteine die Fluoreszenzsignale von CFP und mCherry zur Verfügung und erlauben die Expressionskontrolle und Lokalisierung der Proteine (linke Seite). Bei einer Interaktion erfolgt zusätzlich dazu eine YFP-Fluoreszenz (rechte Seite) (Hemetsberger, 2012).

4.6.12 Hefe-Tropftest

Die Durchführung erfolgte nach „*matchmaker yeast two hybrid manual*“ (Clontech, Mountain View, USA). Diesem folgend wurden 3 ml Selektionsmedium (SD-Leu-Trp) mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Hefestammes angeimpft und bei 28°C, 200 U/min über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellkulturen auf eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 wachsen gelassen (ca. 4 h). Anschließend wurde 1 ml der Zellkultur abzentrifugiert (10 min, 3500 U/min, RT), der Überstand verworfen, das Pellet zweimal mit 1 ml sterilem $H_2O_{bid.}$ gewaschen und letztendlich in 500 μ l sterilem $H_2O_{bid.}$ gelöst. Daraufhin wurde die OD_{600nm} auf 1 mit sterilem $H_2O_{bid.}$ eingestellt und 5 μ l der Zellsuspension in 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen auf SD(-Leu,-Trp)-Platten, SD(-Leu-Trp-His)-Platten und SD(-Leu-Trp-Ade-His)-Platten getropft. Die Platten wurden 4-5 Tage bei 28°C inkubiert und anschließend das Wachstum analysiert.

4.7 Pflanzenmethoden

4.7.1 Maisvarietäten (*Z. mays*)

Um *U. maydis* Infektionen durchzuführen und diese zu Quantifizieren (vgl. Abschnitt 4.7.4 und 4.7.5) oder zum Zwecke der Mikroskopie (vgl. Abschnitt 4.8) wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam verwendet (Olds Seeds, Madison, USA).

4.7.2 Kultivierung von *Z. mays*

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

4.7.3 Blatt- und Blüteninfektionen von *Z. mays* mit *U. maydis*

Für die Infektion von *Z. mays* mit *U. maydis*, wurden die jeweiligen *U. maydis* Stämme über Nacht in YEPS_{light}-Flüssigmedium bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-1 angezogen. Durch Zentrifugation (7min, 3500 U/min, RT) wurden die Zellen geerntet und in sterilem H₂O so resuspendiert, dass sich eine OD_{600nm} von 1 einstellte. Bei Infektionen zum Zwecke der Mikroskopie, wurde eine OD_{600nm} von 3 mit H₂O eingestellt. Standardmäßig wurden "Spritzinfektionen" durchgeführt. Bei Blattinfektionen wurden ca. 300-500 µl der Zellsuspension in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen injiziert. Die Injektionsstelle lag ca. 1 cm über der Erde und ca. 2,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Hierbei wurden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen. Im Falle von Blüteninfektionen wurde ca. 1 ml der

Zellsuspension in ca. 4 Wochen alte Maispflanzen injiziert. Die Injektionsstelle lag auf der Höhe des sich bildenden männlichen Blütenstands.

4.7.4 Quantifizierung von *U. maydis* Blattinfektionen

Zur Quantifizierung der Blatt-Pathogenitätssymptome wurden diese 6 und 12 Tage nach der Infektion je nach Stärke in sieben verschiedenen Kategorien eingeteilt (Tab. 10). Standardmäßig wurden je Stamm drei Infektionsreplikate mit je ca. 40 Pflanzen durchgeführt. Dargestellt wurden schließlich die prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen gemittelten Werte (Kämper *et al.*, 2006).

Tabelle 10: 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 Quantifizierung von *U. maydis* Blüteninfektionen

Zur Quantifizierung der Blüten-Pathogenitätssymptome wurden diese 14 Tage nach der Infektion je nach Stärke in fünf verschiedenen Kategorien eingeteilt (Abb. 31). Standardmäßig wurden je Stamm drei Infektionsreplikate mit je ca. 40 Pflanzen durchgeführt. Dargestellt wurden schließlich die prozentual zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen gemittelten Werte (Schilling *et al.*, 2014).



Abbildung 31: Kategorien für die Quantifizierung der Krankheitssymptome an der männlichen Maisblüte

Die Bonitur der männlichen Blütenstände wurde 14 Tage nach der Infektion mit *U. maydis* vorgenommen. Die Einteilung der Krankheitssymptome erfolgte in den fünf folgenden Kategorien: 1: <50% der Blüte ist mit kleinen Tumoren besetzt, 2: <50% der Blüte ist mit großen Tumoren besetzt, 3: >50% der Blüte ist mit kleinen Tumoren besetzt, 4: >50% der Blüte ist mit großen Tumoren besetzt, 5: Gestörte Entwicklung des Blütenstands. Die nicht infizierte männliche Blüte (n.i) diente als Referenz (Schilling *et al.*, 2014).

4.7.6 Ermittlung der Penetrationseffizienz

Zur Ermittlung der Penetrationseffizienz der *U. maydis* Deletionsmutante SG200 Δ 01829 wurden Maispflanzen mit den *U. maydis* Stämmen SG200 Δ 01829-p123-Potef-mCherry und SG200-p123-Potef-mCherry (Kontrolle) infiziert. 27 Stunden nach Infektion wurde das dritte Blatt der infizierten Maispflanzen mit Calcofluor white angefärbt (vgl. Abschnitt 4.8.2) und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Penetrierende Hyphen zeigten eine mCherry-Fluoreszenz durch eine Fusion von mCherry an den konstitutiv aktiven *otef*-Promotor. Es wurden drei biologische Replikate angefertigt und pro Replikat wurden ca. 100 Appressorien gezählt. Dabei wurde der prozentuale Anteil der penetrierenden Appressorien zur Gesamtzahl aller Appressorien-bildenden Filamente bestimmt.

4.7.7 Kultivierung von *N. benthamiana*

Die Kultivierung von *N. benthamiana* erfolgte unter denselben Gewächshausbedingungen wie im Abschnitt 4.7.2 bereits beschrieben. Samen von *N. benthamiana* wurden gleichmäßig auf Frühstorfer Pikiererde des Typs „P“ ausgesät. Einer Woche später wurden die Keimlinge einzeln in neue Töpfe pikiert und nach weiteren zwei Wochen konnten die Pflanzen für Infiltrationsexperimente genutzt werden.

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. Pro Stamm wurden je zwei Blätter von insgesamt sieben Pflanzen infiltriert. Infizierte Blätter wurden 4 Tage nach der Infiltration geerntet und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

4.8 Mikroskopie

4.8.1 Konfokale Mikroskopie

Sämtliche konfokalen Analysen wurden an einem TCS-SP5 Konfokal-Laserscan Mikroskop (Leica, Bensheim) durchgeführt, die Steuerung des Mikroskops und Aufbereitung der Bilddaten erfolgte durch die Software Leica Application Suite (LAS, Leica, Bensheim). Für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden die in Tabelle 11 angegebenen Anregungs- und Detektionswellenlängen gewählt.

Tabelle 11: Verwendete Anregungs- und Detektionswellenlängen

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

4.8.2 Calcofluor white-Färbung

Die Färbung diente um *on planta* oder *in vitro* Hyphen und Appressorien von *U. maydis* sichtbar zu machen. Für die *on planta* Analyse wurde das dritte Blatt infizierter Maispflanzen geerntet und ein 2 cm langes Stück ca. 1 cm unterhalb der Einstichlöcher ausgeschnitten. Das Blattfragment wurde für ca. 30 sec in Calcofluor white (Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit Wasser wurde die Mittellamelle herausgetrennt und das Präparat mit der Innenseite nach oben auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Blattfragmente per konfokaler Mikroskopie analysiert.

Für die *in vitro* Analyse wurden die wie im Abschnitt 4.4.8 beschrieben behandelten Objektträger für ca. 30 sec in Calcofluor white (Fluorescent Brightener 28; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gefärbt, mit Wasser gewaschen und mikroskopisch analysiert.

Calcofluor-Stammlösung	10 mg/ml Fluorescent Brightener 28 in DMSO; Lagerung dunkel bei -20°C
Calcofluor-Färbelösung	1:100 Verdünnung der Stammlösung in 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; Lagerung dunkel bei 4°C

4.8.3 Färbung infizierter Maisblattproben mit WGA-AF488 und Propidiumiodid

Die Färbung diente der Visualisierung von Pilzhypen (WGA-AF488) in infizierten Pflanzen. Zusätzlich wurden Pflanzenzellwände mit Propidiumiodid gegengefärbt. Die Blattproben wurden über Nacht in Ethanol entfärbt und anschließend in 10% KOH bei 85°C für 3-5 h inkubiert. Daraufhin wurden die Blattproben mit PBS gewaschen bis sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgt für 30 min, währenddessen wurden die Proben 3 x 5 min vakuumfiltriert. Nach erfolgter Färbung wurden die Proben in PBS entfärbt und dunkel bei 4°C bis zur Analyse durch konfokale Mikroskopie gelagert.

WGA/AF-488:	1 mg/ml in H ₂ O Lagerung dunkel bei 4°C
Propidium-Iodid:	10 mg/ml in PBS (pH 7,4) Lagerung dunkel bei 4°C
PBS (pH 7,4):	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 137 mM NaCl

Färbelösung: 20 µg/ml Propidiumiodid
10 µg/ml WGA-AF488
0,02 % Tween20
in PBS (pH 7,4)

4.9 Bioinformatische Analysen

Das Programm Clone Manager 9.0 der Firma Sci-Ed-Software wurde verwendet um Klonierungsstrategien auszuarbeiten sowie um Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenzen miteinander zu vergleichen. Die hierfür verwendeten Sequenzen stammen von dem National Center of Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) und der MIPS *U. maydis* Database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>). Die von diesen Webseiten zur Verfügung gestellten BLAST- (Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul *et al.*, 1990, Altschul *et al.*, 1997)) Funktionen wurden zur Identifizierung von ähnlichen Protein- und Nukleotidsequenzen verwendet. Angegebene vorhergesagte Funktionen von Proteinen wurden unter Anwendung der Software PEDANT (Helmholz-Zentrum, München) ermittelt. Das Programm SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (<http://smart.embl-heidelberg>) wurde für Domänenanalysen eingesetzt. Die Analyse von Proteinen auf eine N-terminale Signalsequenz bzw. anderweitige Lokalisierungssequenzen erfolgte mit dem Programm SignalP 4.1 ((Bendtsen *et al.*, 2004, Nielsen *et al.*, 1997); www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

5 Literaturverzeichnis

- Aguero, C. B., Uratsu, S. L., Greve, C., Powell, A. L. T., Labavitch, J. M., Meredith, C. P., et al. (2005)** Evaluation of tolerance to Pierce's disease and Botrytis in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular plant pathology*, 6, 43-51.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W., et al. (2003)** Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 270, 303-314.
- Aist, J. R. (1976)** Papillae and Related Wound Plugs of Plant-Cells. *Annual review of phytopathology*, 14, 145-163.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990)** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
- Aspinall, G. O. (1959)** Structural Chemistry of the Hemicelluloses. *Adv Carbohydr Chem*, 14, 429-468.
- Aspinall, G. O. (1970)** Arabinans and Xylans. In: *Polysaccharides*. pp. 103–115.
- Aspinall, G. O. (1980)** Chemistry of Cell Wall Polysaccharides. In: *Carbohydrates: Structure and Function A Comprehensive Treatise*. (Preiss, J., ed.). pp. 473–500.
- Aspinall, G. O. and Ferrier, R. J. (1957)** The Constitution of Barley Husk Hemicellulose. *J Chem Soc*, 4188-4194.
- Austin, M. J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B. J., Jones, J. D. G. and Parker, J. E. (2002)** Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science*, 295, 2077-2080.
- Ausubel, F. M. (2002)** *Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. New York: Wiley.
- Ausubel, F. M. (2005)** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature immunology*, 6, 973-979.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P. (2002)** The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, 295, 2073-2076.

- Bakkeren, G., Kämper, J. and Schirawski, J. (2008)** Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genetics and Biology*, 45, S15-S21.
- Banuett, F. (1995)** Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual review of genetics*, 29, 179-208.
- Banuett, F. and 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.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996)** Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, 122, 2965-2976.
- Bao, Z. L., Yang, H. J. and Hua, J. (2013)** Perturbation of cell cycle regulation triggers plant immune response via activation of disease resistance genes. *P Natl Acad Sci USA*, 110, 2407-2412.
- Basse, C. W. and Steinberg, G. (2004)** *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 5, 83-92.
- Bauer, R., Oberwinkler, F. and Vanky, K. (1997)** Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can J Bot*, 75, 1273-1314.
- Bechinger, C., Giebel, K. F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H. B. and Bastmeyer, M. (1999)** Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science*, 285, 1896-1899.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., et al. (2009)** A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science*, 323, 101-106.
- Begerow, D., Stoll, M. and Bauer, R. (2006)** A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia*, 98, 906-916.
- Bellincampi, D., Camardella, L., Delcour, J. A., Desseaux, V., D'Ovidio, R., Durand, A., et al. (2004)** Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. *Bba-Proteins Proteom*, 1696, 265-274.
- Bellincampi, D., Cervone, F. and Lionetti, V. (2014)** Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Front Plant Sci*, 5.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004)** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340, 783-795.

- Bhavsar, A. P., Brown, N. F., Stoepel, J., Wiermer, M., Martin, D. D. O., Hsu, K. J., et al. (2013)** The Salmonella Type III Effector SspH2 Specifically Exploits the NLR Co-chaperone Activity of SGT1 to Subvert Immunity. *PLoS pathogens*, 9.
- Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q. H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., et al. (2004)** RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *The Plant Cell*, 16, 3480-3495.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A. J., et al. (2003)** Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: Resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 93, 712-719.
- Birren, F., and Lander (2003)** Fungal Genome Initiative A White Paper for Fungal Comparative Genomics. *The Fungal Genome Initiative Steering Committee*
- Bohlmann, R. (1996)**. Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Bölker, M. (2001)** *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147, 1395-1401.
- Boller, T. and Felix, G. (2009)** A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Rev Plant Biol*, 60, 379-406.
- Boter, M., Amigues, B., Peart, J., Breuer, C., Kadota, Y., Casais, C., et al. (2007)** Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *The Plant Cell*, 19, 3791-3804.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., et al. (2005)** Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, 5, 212-221.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrugge, M. (2004)** A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, 272, 216-226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R. (2001)** Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 42, 1047-1063.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. and Kahmann, R. (2009)** *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual review of phytopathology*, 47, 423-445.
- Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V. and Kahmann, R. (2014)** Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS pathogens*, 10, e1003866.
- Brito, N., Espino, J. J. and Gonzalez, C. (2006)** The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe In*, 19, 25-32.
- Broomfield, P. L. and Hargreaves, J. A. (1992)** A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current genetics*, 22, 117-121.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F. and De Lorenzo, G. (2010a)** A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *P Natl Acad Sci USA*, 107, 9452-9457.
- Burton, R. A., Gidley, M. J. and Fincher, G. B. (2010)** Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature chemical biology*, 6, 724-732.
- Caprari, C., Bergmann, C., Migheli, Q., Salvi, G., Albersheim, P., Darvill, A., et al. (1993)** *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43, 453-462.
- Celio, G. J., Mims, C. W. and Richardson, E. A. (2004)** Ultrastructure and immunocytochemistry of the host-pathogen interface in poinsettia leaves infected with powdery mildew. *Can J Bot*, 82, 421-429.
- Chacón-Martínez, C., Anzola, J., Rojas, A., Hernández, F., Junca, J., Ocampo, H., et al. (2004)** Identification and characterization of the α -L-arabinofuranosidase B of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 64, 201-208.
- Chavez, R., Bull, P. and Eyzaguirre, J. (2006)** The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J Biotechnol*, 123, 413-433.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G. (2006)** The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell*, 18, 465-476.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. and 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. and Hsu, L. (1972)** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 2110-2114.
- Collier, S. M. and Moffett, P. (2009)** NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Trends in plant science*, 14, 521-529.
- Crous, J. M., Pretorius, I. S. and vanZyl, W. H. (1996)** Cloning and expression of the alpha-L-arabinofuranosidase gene (ABF2) of *Aspergillus niger* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 46, 256-260.
- Cui, H., Wang, Y., Xue, L., Chu, J., Yan, C., Fu, J., et al. (2010)** *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB perturbs Arabidopsis hormone signaling by activating MAP kinase 4. *Cell host & microbe*, 7, 164-175.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. and Bellincampi, D. (2004)** Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Bba-Proteins Proteom*, 1696, 237-244.
- da Silva Correia, J. D., Miranda, Y., Leonard, N. and Ulevitch, R. (2007)** SGT1 is essential for Nod1 activation. *P Natl Acad Sci USA*, 104, 6764-6769.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. (2001)** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-833.
- Daudi, A., Cheng, Z. Y., O'Brien, J. A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. M., et al. (2012)** The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity. *The Plant Cell*, 24, 275-287.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., et al. (2003)** Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *P Natl Acad Sci USA*, 100, 8024-8029.
- Djamei, A. and Kahmann, R. (2012)** *Ustilago maydis*: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. *PLoS pathogens*, 8, e1002955.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., et al. (2011)** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478, 395-398.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I. A., Ayliffe, M. A., et al. (2006)** Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *P Natl Acad Sci USA*, 103, 8888-8893.

- Dodds, P. N. and 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. and Hemetsberger, C. (2013)** Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *The New phytologist*, 198, 1001-1016.
- Doehlemann, G., Reissmann, S., Assmann, D., Fleckenstein, M. and Kahmann, R. (2011)** Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular microbiology*, 81, 751-766.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., et al. (2009)** Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens*, 5, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., et al. (2008)** Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J*, 56, 181-195.
- Dubacq, C., Guerois, R., Courbeyrette, R., Kitagawa, K. and Mann, C. (2002)** Sgt1p contributes to cyclic AMP pathway activity and physically interacts with the adenylyl cyclase Cyr1p/Cdc35p in budding yeast. *Eukaryotic Cell*, 1, 568-582.
- Ebringerová, A. and Heinze, T. (2000)** Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun*, 21, 542–556.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P., et al. (2006)** A Ferroxidation/Permeation Iron Uptake System Is Required for Virulence in *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online*, 18, 3332-3345.
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., et al. (2013)** Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in Arabidopsis. *Plant physiology*, 161, 1433-1444.
- Emmett, R. W. and Parbery, D. G. (1975)** Appressoria. *Annual review of phytopathology*, 13, 147-167.
- Enkerli, J., Felix, G. and Boller, T. (1999)** The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant physiology*, 121, 391-397.

- Espinosa, A. and Alfano, J. R. (2004)** Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cellular microbiology*, 6, 1027-1040.
- Fahlgren, A., Westermarck, L., Akopyan, K. and Fallman, M. (2009)** Cell type-specific effects of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence effectors. *Cellular microbiology*, 11, 1750-1767.
- Feng, J., Wang, F., Hughes, G. R., Kaminskyj, S. and Wei, Y. D. (2011)** An important role for secreted esterase in disease establishment of the wheat powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Can J Microbiol*, 57, 211-216.
- Ferrari, S., Galletti, R., Pontiggia, D., Manfredini, C., Lionetti, V., Bellincampi, D., et al. (2008)** Transgenic expression of a fungal endopolygalacturonase increases plant resistance to pathogens and reduces auxin sensitivity. *Plant physiology*, 146, 669-681.
- Ferrari, S., Sella, L., Janni, M., De Lorenzo, G., Favaron, F. and D'Ovidio, R. (2012)** Transgenic expression of polygalacturonase-inhibiting proteins in *Arabidopsis* and wheat increases resistance to the flower pathogen *Fusarium graminearum*. *Plant Biology*, 14, 31-38.
- Fischer, G. W. (1953)** *Manual of the North American smut fungi*. New York,: Ronald Press Co.
- Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J. and Perez-Martin, J. (2006)** Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *The Plant Cell*, 18, 2369-2387.
- Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S. and Oliver, R. P. (2008)** Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular microbiology*, 10, 1421-1428.
- Fry, S. C. (2004)** Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 161, 641-675.
- Fry, S. C., Aldington, S., Hetherington, P. R. and Aitken, J. (1993)** Oligosaccharides as Signals and Substrates in the Plant-Cell Wall. *Plant physiology*, 103, 1-5.
- Furman-Matarasso, N., Cohen, E., Du, Q., Chejanovsky, N., Hanania, U. and Avni, A. (1999)** A point mutation in the ethylene-inducing xylanase elicitor inhibits the beta-1-4-endoxylanase activity but not the elicitation activity. *Plant physiology*, 121, 345-351.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. and Kahmann, R. (1992)** A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, 68, 647-657.

- Glitso, L. V. and Knudsen, K. E. B. (1999)** Milling of whole grain rye to obtain fractions with different dietary fibre characteristics. *J Cereal Sci*, 29, 89-97.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2000)** FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell*, 5, 1003-1011.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. and Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *P Natl Acad Sci USA*, 87, 4645-4649.
- Hahn, M. and Mendgen, K. (2001)** Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr Opin Plant Biol*, 4, 322-327.
- Hann, D. R. and Rathjen, J. P. (2007)** Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 49, 607-618.
- Hayashi, T. (1989)** Xyloglucans in the Primary-Cell Wall. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 40, 139-168.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. and 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. (2012)** Das Effektorprotein Pep1 und seine Rolle in der Biotrophie von Brandpilzen. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. and Doehlemann, G. (2012)** The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS pathogens*, 8, e1002684.
- Hermanns, M., Slusarenko, A. J. and Schlaich, N. L. (2003)** Organ-specificity in a plant disease is determined independently of R gene signaling. *Mol Plant Microbe In*, 16, 752-759.
- Hespell, R. B., OBryan, P. J., Moniruzzaman, M. and Bothast, R. J. (1997)** Hydrolysis by commercial enzyme mixtures of AFEX-treated corn fiber and isolated xylans'. *Appl Biochem Biotech*, 62, 87-97.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987)** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267-272.
- Hofgen, R. and Willmitzer, L. (1988)** Storage of Competent Cells for Agrobacterium Transformation. *Nucleic Acids Research*, 16, 9877-9877.
- Holliday, R. (1961)** The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb*, 2, 204-230.

- Holliday, R. (1964)** The induction of mitotic recombination by mitomycin c in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*, 50, 323-335.
- Holliday, R. (1974)** Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics*, 78, 273-287.
- Holliday, R. (2004)** Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA repair*, 3, 671-682.
- Holton, C. S., Hoffmann, J. A. and Duran, R. (1968)** Variation in Smut Fungi. *Annual review of phytopathology*, 6, 213-+.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A. R., Knogge, W. and Deising, H. B. (2011)** When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of plant physiology*, 168, 51-62.
- Hoser, R., Zurczak, M., Lichocka, M., Zuzga, S., Dadlez, M., Samuel, M. A., et al. (2013)** Nucleocytoplasmic partitioning of tobacco N receptor is modulated by SGT1. *New Phytologist*, 200, 158-171.
- Hromadkova, Z., Ebringerova, A., Petrakova, E. and Schraml, J. (1987)** Structural Features of a Rye-Bran Arabinoxylan with a Low Degree of Branching. *Carbohydrate research*, 163, 73-79.
- Hückelhoven, R. (2007)** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual review of phytopathology*, 45, 101-127.
- Ishii, T. (1997)** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127, 111-127.
- Izydorczyk, M. S. and Biliaderis, C. G. (1995)** Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr Polym*, 28, 33-48.
- Jeoh, T., Ishizawa, C. I., Davis, M. F., Himmel, M. E., Adney, W. S. and Johnson, D. K. (2007)** Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol Bioeng*, 98, 112-122.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. and Valent, B. (2000)** Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo Journal*, 19, 4004-4014.
- Jones, D. A. and Takemoto, D. (2004)** Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr Opin Immunol*, 16, 48-62.
- Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006)** The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.

- Joosten, M. H. A. J. and de Wit, P. J. G. M. (1999)** The tomato - *Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annual review of phytopathology*, 37, 335-367.
- Juge, N. (2006)** Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in plant science*, 11, 359-367.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M. and Kämper, J. (2000)** *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In: *Fungal Pathology*. (Kronstad, J. W., ed.). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer academic publishers, pp. 347-371.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., et al. (2006)** Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 11086-11091.
- Kämper, J. (2004)** A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, 271, 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., et al. (2006)** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444, 97-101.
- Khrunyk, Y., Munch, K., Schipper, K., Lupas, A. N. and Kahmann, R. (2010)** The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytologist*, 187, 957-968.
- Kim, M. G., da Cunha, L., McFall, A. J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., et al. (2005)** Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell*, 121, 749-759.
- Kim, N. H., Kim, D. S., Chung, E. H. and Hwang, B. K. (2014)** Pepper Suppressor of the G2 Allele of *skp1* Interacts with the Receptor-Like Cytoplasmic Kinase1 and Type III Effector AvrBsT and Promotes the Hypersensitive Cell Death Response in a Phosphorylation-Dependent Manner. *Plant physiology*, 165, 76-91.
- King, B. C., Waxman, K. D., Nenni, N. V., Walker, L. P., Bergstrom, G. C. and Gibson, D. M. (2011)** Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol Biofuels*, 4.
- Kitagawa, K., Skowrya, D., Elledge, S. J., Harper, J. W. and Hieter, P. (1999)** SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Molecular cell*, 4, 21-33.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren van Themaat, E., van der Does, H. C., et al. (2012)** Sequential delivery

- of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS pathogens*, 8, e1002643.
- Koeck, M., Hardham, A. R. and Dodds, P. N. (2011)** The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology*, [in press].
- Koncz, C. and Schell, J. (1986)** The Promoter of TI-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector. *Molecular & General Genetics*, 204, 383-396.
- Krasileva, K. V., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B. J. (2010)** Activation of an *Arabidopsis* Resistance Protein Is Specified by the in Planta Association of Its Leucine-Rich Repeat Domain with the Cognate Oomycete Effector. *The Plant Cell*, 22, 2444-2458.
- Kubicek, C. P., Starr, T. L. and Glass, N. L. (2014)** Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol*, 52, 427-451.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lanver, D., Berndt, P., Tollot, M., Naik, V., Vranes, M., Warmann, T., et al. (2014)** Plant Surface Cues Prime *Ustilago maydis* for Biotrophic Development. *PLoS pathogens*, 10.
- Laurie, J. D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Guldener, U., et al. (2012)** Genome Comparison of Barley and Maize Smut Fungi Reveals Targeted Loss of RNA Silencing Components and Species-Specific Presence of Transposable Elements. *The Plant Cell*, 24, 1733-1745.
- Lee, Y. T., Jacob, J., Michowski, W., Nowotny, M., Kuznicki, J. and Chazin, W. J. (2004)** Human Sgt1 binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 domain and not the tetratricopeptide repeat domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 16511-16517.
- Leister, R. T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O. and Staskawicz, B. J. (2005)** Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 17, 1268-1278.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., et al. (2005)** Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310, 1180-1183.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X. W. and Dinesh-Kumar, S. P. (2002)** Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-

- mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *The Plant Cell*, 14, 1483-1496.
- Llorente, F., Alonso-Blanco, C., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L. and Molina, A. (2005)** ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J*, 43, 165-180.
- Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Washburn, N. R., et al. (2007)** The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews*, 220, 60-81.
- MargollesClark, E., Tenkanen, M., NakariSetala, T. and Penttila, M. (1996)** Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 62, 3840-3846.
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D. and Gold, S. E. (2002)** The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 35, 1-20.
- Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Petrilli, V. and Tschopp, J. (2007)** A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nature immunology*, 8, 497-503.
- Mendgen, K. and Hahn, M. (2002)** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in plant science*, 7, 352-356.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., et al. (2009)** Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 71, 895-911.
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R. W. (2003)** Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15, 809-834.
- Mims, C. W., Snetselaar, K. M. and Richardson, E. A. (1992)** Ultrastructure of the Leaf Stripe Smut Fungus *Ustilago striiformis* - Host-Pathogen Relationship and Teliospore Development. *Int J Plant Sci*, 153, 289-300.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., et al. (2007)** CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA*, 104, 19613-19618.
- Montillet, J. L. and Hirt, H. (2013)** New checkpoints in stomatal defense. *Trends in plant science*, 18, 295-297.
- Moscetti, I., Tundo, S., Janni, M., Sella, L., Gazzetti, K., Tauzin, A., et al. (2013)** Constitutive Expression of the Xylanase Inhibitor TAXI-III Delays

- Fusarium Head Blight Symptoms in Durum Wheat Transgenic Plants. *Mol Plant Microbe In*, 26, 1464-1472.
- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Assmann, D. and Doehlemann, G. (2013)** Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS pathogens*, 9, e1003177.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A. and de Vries, R. P. (2008)** The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 45 Suppl 1, S63-70.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263-273.
- Nafisi, M., Stranne, M., Zhang, L. S., van Kan, J. A. L. and Sakuragi, Y. (2014)** The Endo-Arabinanase BcAra1 Is a Novel Host-Specific Virulence Factor of the Necrotic Fungal Phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe In*, 27, 781-792.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. and vonHeijne, G. (1997)** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10, 1-6.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F., 3rd and Dangl, J. L. (2003)** Recognition and response in the plant immune system. *Annual review of genetics*, 37, 579-609.
- Noel, L. D., Cagna, G., Stuttmann, J., Wirthmuller, L., Betsuyaku, S., Witte, C. P., et al. (2007)** Interaction between SGT1 and Cytosolic/Nuclear HSC70 chaperones regulates *Arabidopsis* immune responses. *The Plant Cell*, 19, 4061-4076.
- Nomura, K., Melotto, M. and He, S. Y. (2005)** Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 361-368.
- Ntoukakis, V., Saur, I. M., Conlan, B. and Rathjen, J. P. (2014)** The changing of the guard: the Pto/Prf receptor complex of tomato and pathogen recognition. *Curr Opin Plant Biol*, 20, 69-74.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. (2004)** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews*, 198, 249-266.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S. and Bolwell, G. P. (2012)** Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236, 765-779.

- O'Neill, M. and York, W. (2003)** The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The plant Cell wall* pp. 1-54.
- Ordaz-Ortiz, J. J. and Saulnier, L. (2005)** Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. *J Cereal Sci*, 42, 119-125.
- Pastell, H., Virkki, L., Harju, E., Tuomainen, P. and Tenkanen, M. (2009)** Presence of 1→3-linked 2-O-beta-D-xylopyranosyl-alpha-L-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans. *Carbohydrate research*, 344, 2480-2488.
- Peart, J. R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D. C., et al. (2002)** Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *P Natl Acad Sci USA*, 99, 10865-10869.
- Perez-De-Luque, A., Lozano, M. D., Moreno, M. T., Testillano, P. S. and Rubiales, D. (2007)** Resistance to broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba*): cell wall changes associated with prehaustorial defensive mechanisms. *Annals of Applied Biology*, 151, 89-98.
- Perez-De-Luque, A., Moreno, M. T. and Rubiales, D. (2008)** Host plant resistance against broomrapese (*Orobanche* spp.): defence reactions and mechanisms of resistance. *Annals of Applied Biology*, 152, 131-141.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T. and Martinez, J. (2002)** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 5, 53-63.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002)** Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S. C. (2009)** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5, 308-316.
- Pordesimo, L. O., Hames, B. R., Sokhansanj, S. and Edens, W. C. (2005)** Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass Bioenerg*, 28, 366-374.
- Puls, J., Schroder, N., Stein, A., Janzon, R. and Saake, B. (2006)** Xylans from oat spelts and birch kraft pulp. *Macromol Symp*, 232, 85-92.
- Rajeshwari, R., Jha, G. and Sonti, R. V. (2005)** Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol Plant Microbe In*, 18, 830-837.

- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., et al. (2013)** *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization In: *Biomass Now – Cultivation and Utilization*. (Matovic, D. M. D., ed.).
- Redkar, A. (2014)** Functional characterization of an organ-specific effector See1 of *Ustilago maydis*. Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
- Redkar, A., Schilling, L., Hoser, R., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, G., and Doehlemann, G. (2014)**, A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* is Required to Guide Host Cells to Form Tumors in Maize Leaves. *The Plant Cell* (in Revision)
- Rehnstrom, A. L., Free, S. J. and Pratt, R. G. (1994)** Isolation, Characterization and pathogenicity of *Sclerotinia trifoliorum* arabinofuranosidase-deficient mutants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 44, 199-206.
- Ryan, C. A. (1987)** Oligosaccharide Signaling in Plants. *Annu Rev Cell Biol*, 3, 295-317.
- Salic, A. and Mitchison, T. J. (2008)** A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *P Natl Acad Sci USA*, 105, 2415-2420.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York*.
- Sanchez-Rodriguez, C., Estevez, J. M., Llorente, F., Hernandez-Blanco, C., Jorda, L., Pagan, I., et al. (2009)** The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe In*, 22, 953-963.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.
- Santos, C. R., Polo, C. C., Costa, M. C. M. F., Nascimento, A. F. Z., Meza, A. N., Cota, J., et al. (2014)** Mechanistic Strategies for Catalysis Adopted by Evolutionary Distinct Family 43 Arabinanases. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 7362-7373.
- Sattler, S. E. and Funnell-Harris, D. L. (2013)** Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? *Front Plant Sci*, 4.
- Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V. and Doehlemann, G. (2014)** Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Molecular plant pathology*, 15, 780-789.
- Schirawski, J., Böhnert, H. U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L. and Kahmann, R. (2005)** Endoplasmic reticulum glucosidase II is

- required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 17, 3532-3543.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Munch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., et al. (2010)** Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison. *Science*, 330, 1546-1548.
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F., Beldman, G. and Voragen, A. G. J. (1999)** Structural features of (glucurono)arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. *J Cereal Sci*, 29, 63-75.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N. X., Elsasser, S., et al. (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., Schafer, W., Martin, T., et al. (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. and Panstruga, R. (2003)** Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 41, 641-667.
- Shirasu, K. (2009)** The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 139-164.
- Skibbe, D. S., Doehlemann, G., Fernandes, J. and Walbot, V. (2010)** Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science*, 328, 89-92.
- Snetselaar, K. M., Bölker, M. and Kahmann, R. (1996)** *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 20, 299-312.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1992)** Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 84, 193-203.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1993)** Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology*, 83, 843-850.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1994)** Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res*, 98, 347-355.
- Southern, E. M. (1975)** Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98, 503-&.
- Spanu, P. D., Abbott, J. C., Amselem, J., Burgis, T. A., Soanes, D. M., Stuber, K., et al. (2010)** Genome expansion and gene loss in powdery

- mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 330, 1543-1546.
- Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A. and Hawes, C. (2006)** Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, 1, 2019-2025.
- Spoel, S. H. and Dong, X. N. (2012)** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol*, 12, 89-100.
- Sun, Y. D., Li, L., Macho, A. P., Han, Z. F., Hu, Z. H., Zipfel, C., et al. (2013)** Structural Basis for flg22-Induced Activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science*, 342, 624-628.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Coge, V., Bonas, U., et al. (2010)** Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *New Phytologist*, 187, 983-1002.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K. and Shirasu, K. (2003)** HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 11777-11782.
- Takken, F. L. W., Albrecht, M. and Tameling, W. I. L. (2006)** Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 383-390.
- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., et al. (2014)** A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife*, 3, e01355.
- Thomma, B. P., HP, V. A. N. E., Crous, P. W. and PJ, D. E. W. (2005)** *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular plant pathology*, 6, 379-393.
- Tomme, P., Warren, R. A. and Gilkes, N. R. (1995)** Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in microbial physiology*, 37, 1-81.
- Tor, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., et al. (2002)** *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *The Plant Cell*, 14, 993-1003.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. and Holloman, W. K. (1988)** Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and cellular biology*, 8, 3703-3709.
- Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O., Pataky, J. K. and Guevara-Lara, F. (1995)** Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source - biology,

- composition, and production. *Critical reviews in food science and nutrition*, 35, 191-229.
- van der Biezen, E. A. and Jones, J. D. G. (1998)** Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, 23, 454-456.
- van der Hoorn, R. A. L. and Kamoun, S. (2008)** From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, 20, 2009-2017.
- van Esse, H. P., Thomma, B. P. H. J., van 't Klooster, J. W. and de Wit, P. J. G. M. (2006)** Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast. *Journal of experimental botany*, 57, 599-608.
- van Kan, J. A. (2006)** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science*, 11, 247-253.
- Vazquez, M. J., Alonso, J. L., Dominguez, H. and Parajo, J. C. (2000)** Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci Tech*, 11, 387-393.
- Waadt, R. and Kudla, J. (2008)** In Planta Visualization of Protein Interactions Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). *CSH Protoc*, 2008, pdb prot4995.
- Walton, J. D. (1994)** Deconstructing the Cell-Wall. *Plant physiology*, 104, 1113-1118.
- Wang, Y. L., Gao, M. J., Li, Q., Wang, L. Y., Wang, J. J., Jeon, J. S., et al. (2008)** OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. *Mol Plant Microbe In*, 21, 294-303.
- Whistler, R. L. and Mcgilvray, D. I. (1955)** 2-O-Alpha-D-Xylopyranosyl-L-Arabinose from Hemicellulose-B of Corn Cob. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1884-1885.
- Willmann, R., Lajunen, H. M., Erbs, G., Newman, M. A., Kolb, D., Tsuda, K., et al. (2011)** *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *P Natl Acad Sci USA*, 108, 19824-19829.
- Wilson, R. A. and Talbot, N. J. (2009)** Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 185-195.
- Yajima, W., Liang, Y. and Kav, N. N. V. (2009)** Gene Disruption of an Arabinofuranosidase/beta-Xylosidase Precursor Decreases *Sclerotinia sclerotiorum* Virulence on Canola Tissue. *Mol Plant Microbe In*, 22, 783-789.

- Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C. A. (2006)** The cell surface leucine-rich repeat receptor for *AtPep1*, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 10104-10109.
- Zahiri, A., Heimel, K., Wahl, R., Rath, M. and Kämper, J. (2010)** The *Ustilago maydis* Forkhead Transcription Factor Fox1 Is Involved in the Regulation of Genes Required for the Attenuation of Plant Defenses During Pathogenic Development. *Mol Plant Microbe In*, 23, 1118-1129.
- Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kämper, J., et al. (2006)** Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 43, 727-738.
- Zhang, X. W., Jia, L. J., Zhang, Y., Jiang, G., Li, X., Zhang, D., et al. (2012)** In planta stage-specific fungal gene profiling elucidates the molecular strategies of *Fusarium graminearum* growing inside wheat coleoptiles. *The Plant Cell*, 24, 5159-5176.
- Zhao, Z. T., Liu, H. Q., Wang, C. F. and Xu, J. R. (2013)** Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *Bmc Genomics*, 14.
- Zipfel, C. and Felix, G. (2005)** Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol*, 8, 353-360.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., et al. (2006)** Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*, 125, 749-760.

6 Anhang

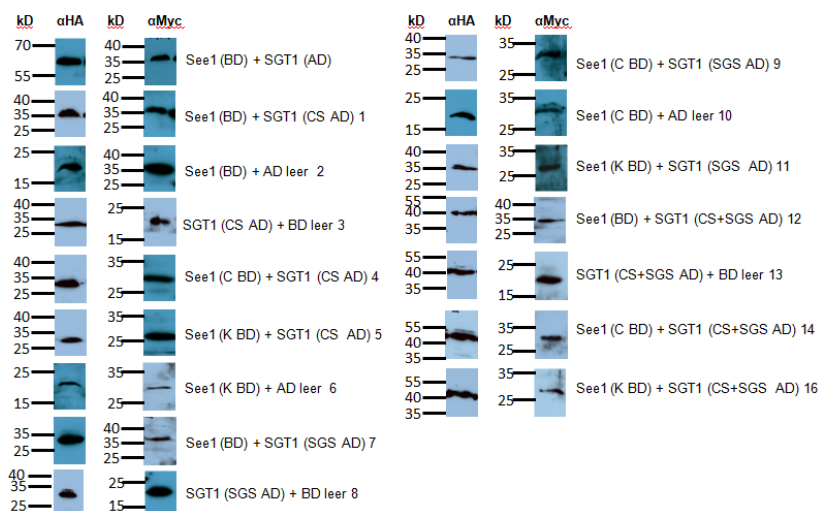


Abbildung 32: Expressionsnachweis der einzelnen Proteinregionen von See1 und SGT1

Die Proteinexpression der für die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse verwendeten *S. cerevisiae* Stämme wurde durch Western Blot Analyse überprüft. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines anti-HA-spezifischen bzw. eines anti-Myc-spezifischen Antikörpers. Die erwarteten Größen sind in Tabelle 12 angegeben. BD = Gal4-Bindedomäne (enthält Myc-tag), AD = Gal4-Aktivierungsdomäne (enthält HA-tag), SGT1-Domänen: TPR = *tetratricopeptide repeat*-Domäne (AS: 1-106), CS = *CHORD*-SGT1-Domäne (AS: 160-240), SGS = SGT1 spezifische-Domäne (AS: 276-362), CS+SGS = *CHORD*-SGT1-Domäne + variable Domäne + SGT1 spezifische-Domäne (AS: 160-362). See1 Regionen: K = konservierte Region (AS: 34-83) und eine C = C-terminale Region (AS: 57-157).

Tabelle 12: Erwartet Größen für den Expressionsnachweis der einzelnen Proteinregionen von See1 und SGT1

BD = Gal4-Bindedomäne (enthält Myc-tag), AD = Gal4-Aktivierungsdomäne (enthält HA-tag), SGT1-Domänen: TPR = *tetratricopeptide repeat*-Domäne (AS: 1-106), CS = *CHORD*-SGT1-Domäne (AS: 160-240), SGS = SGT1 spezifische-Domäne (AS: 276-362), CS+SGS = *CHORD*-SGT1-Domäne + variable Domäne + SGT1 spezifische-Domäne (AS: 160-362). See1 Regionen: K = konservierte Region (AS: 34-83) und eine C = C-terminale Region (AS: 57-157).

Stamm	αHA (erwartete Größe in kD)	αMyc (erwartete Größe in kD)
See1 (BD) + SGT1 (AD)	57,8	35,5
See1 (BD) + SGT1 (CS AD)	27,2	35,5
See1 (BD) + AD leer	20,5	35,5
SGT1 (CS AD) + BD leer	27,2	21,8
See1 (C BD) + SGT1 (CS AD)	27,2	31,6
See1 (K BD) + SGT1 (CS AD)	27,2	26,1
See1 (K BD) + AD leer	20,5	35,5
See1 (BD) + SGT1 (SGS AD)	27,9	35,5
SGT1 (SGS AD) + BD leer	27,9	21,8
See1 (C BD) + SGT1 (SGS AD)	27,9	31,6
See1 (C BD) + AD leer	20,5	31,6
See1 (K BD) + SGT1 (SGS AD)	27,9	26,1
See1 (BD) + SGT1 (CS+SGS AD)	41,0	35,5
SGT1 (CS+SGS AD) + BD leer	41,0	21,8
See1 (C BD) + SGT1 (CS+SGS AD)	41,0	31,6
See1 (K BD) + SGT1 (CS+SGS AD)	41,0	26,1

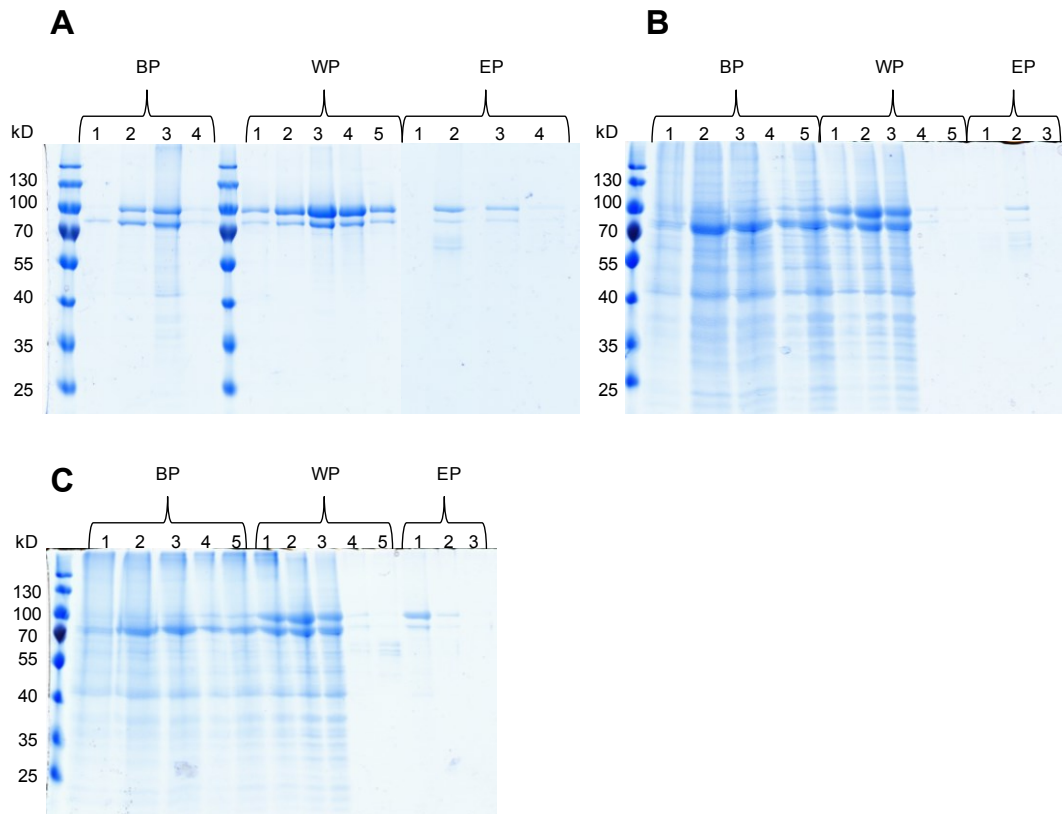


Abbildung 33: SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen einer Ni-NTA Aufreinigung der mutierten Versionen von Um01829

Um01829^{mutAS410-412} (A), Um01829^{mutAS499} (B) und Um01829^{mutAS410-412+499} (C) wurden im Überstand von *P. pastoris* überexprimiert und anschließend durch Ni-NTA aufgereinigt. Die Abbildung zeigt eine SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen einer Ni-NTA Aufreinigung von Um01829^{mutAS410-412} (A), Um01829^{mutAS499} (B) und Um01829^{mutAS410-412+499} (C). BP = Bindepuffer, WP = Waschluterpuffer, EP = Elutionspuffer.

Tabelle 13: Verwendete *U. maydis* Stämme

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200	a1 mfa2 bE1 bW2	Phleo	Kämper <i>et al.</i> , 2006
SG200AM1	a1 mfa2 bE1 bW2 <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{um01779} -3eGFP] <i>ip</i> ^s	Phleo, Cbx	Mendoza-Mendoza <i>et al.</i> , 2009
SG200-Insertion-um00154	a1 mfa2 bE1 bW2 um00154 ^r [FTR- <i>P</i> _{hsp70} - <i>hph</i> - <i>T</i> _{nos} -FRT]um00154 ^s	Phleo	Diese Arbeit
SG200-mcherry-HA	a1 mfa2 bE1 bW2 <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{oter} -mcherry-ha] <i>ip</i> ^s	Phleo, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δ1829-mCherry-HA	a1 mfa2 bE1 bW2 <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{oter} -mcherry-ha] <i>ip</i> ^s	Phleo, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δ1829-um01829-mCherry-HA	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829 <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um01829-mcherry-ha] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum00154	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00154	Phleo, Hyg	Diese Arbeit
SG200Δum00154 (mit FRT)	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00154	Phleo	Diese Arbeit
SG200Δum00154-um00153(2kb)	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00154::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt(2kb)} -um00153] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum00154-um00154(1kb)	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00154::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt(1kb)} -um00154] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum00154-um00154(2kb)	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00154::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt(2kb)} -um00154] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum00154-um00154(Ppit2)	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum00154::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{pit2} -um00154] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum01130	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01130	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum01690	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01690	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum01690-um01690	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01690::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um01690] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum01829	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum01829-AM1	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829 <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{um01779} -3eGFP] <i>ip</i> ^s	Phleo, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum01829-um01829	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um01829] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum01829-um01829 ^{mutAS:410-412}	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um01829 ^{mutAS:410-412}] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum01829-um01829 ^{mutAS:410-412+499}	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um01829 ^{mutAS:410-412+499}] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum01829-um01829 ^{mutAS:499}	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum01829::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um01829 ^{mutAS:499}] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Diese Arbeit
SG200Δum02239	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02239	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum02239-um02239	a1 mfa2 bE1 bW2 Δum02239::hph <i>ip</i> ^r [<i>P</i> _{wt} -um02239] <i>ip</i> ^s	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014

SG200Δum03046	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum03046	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum03650	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum03650	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum03650-um03650	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum03650:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um03650]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05223	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05223	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05306	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05306	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05306-um05306	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05306:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um05306]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05311	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05311	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05311-um05311	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05311:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um05311]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05318	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05318	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05318-um05318	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05318:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um05318]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05439	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05439	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05439-um05439	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05439:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um05439]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum05495	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum05495	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum06127	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum06127	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum06222	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum06222	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum06223	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum06223	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum10553	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum10553	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum11060	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11060	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum11060-um11060	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11060:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um11060]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum11763	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum11763	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum12217	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum12217	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum12217-um12217	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum12217:: <i>hph</i> <i>ip^r[P_{wt}-um12217]jip^s</i>	Phleo, Hyg, Cbx	Schilling <i>et al.</i> , 2014
SG200Δum12313	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δum12313	Phleo, Hyg	Schilling <i>et al.</i> , 2014

Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
KL318	ppi RT fw	ACATCGTCAAGGCTATCG	qRT-PCR <i>ppi</i>
KL319	ppi RT rv	AAAGAACACCCGGACTTGG	qRT-PCR <i>ppi</i>
OAli03	um12313 RT fw	CGTGCTCAAGCTCAACG	qRT-PCR <i>um12313</i>
OAli04	um12313 RT rv	TGCGACCAGATGCGATG	qRT-PCR <i>um12313</i>
OAli05	um06127 RT fw	ACGACGTAGAGTATGGTCAC	qRT-PCR <i>um06127</i>
OAli06	um06127 RT rv	GGCAGAAGAGAACCACTTTG	qRT-PCR <i>um06127</i>
OAli07	um10553 RT fw	TGCCCTCTTCTCTGTCTAC	qRT-PCR <i>um10553</i>
OAli08	um10553 RT rv	CGACTCTGGGTGGAAATG	qRT-PCR <i>um10553</i>
OAli100	compl. KO12217_rv	CATATGGATGATGAAAGGATGCCG	Komplementation KO <i>um12217</i>
OAli109	compl. KO11060_fw	CATATGCGCCGGGTGGCCTTGC	Komplementation KO <i>um11060</i>
OAli110	compl. KO11060_rv	AGGCGGCCGCTCAGGCCTTGTAGTTCCTG	Komplementation KO <i>um11060</i>
OAli113	compl. KO05306_fw	CATATGCCTGCACATCTCAACATC	Komplementation KO <i>um05306</i>
OAli114	compl. KO05306_rv	AGGCGGCCGCTCAAGTAGGCGGTCTGTAAG	Komplementation KO <i>um05306</i>
OAli117	compl. KO05311_fw	CGCAATAAGCTTTGTATTGTGAGCCCGTGCTG	Komplementation KO <i>um05311</i>
OAli118	compl. KO05311_rv	CGCATCATGCATATCCGATGAGTCGAAACAC	Komplementation KO <i>um05311</i>
OAli119	compl. KO05318_fw	TAGCTTGCGGCCGCACAAAAGCGTGTACGAAG	Komplementation KO <i>um05318</i>
OAli120	compl. KO05318_rv	CTGCGGCATATGCTAGAAGTGCAAAAGCAAGTG	Komplementation KO <i>um05318</i>
OAli13	um05311 RT fw	GAGCGTCGAGAATCTCAAG	qRT-PCR <i>um05311</i>
OAli14	um05311 RT rv	CGTGGACAGACTCGTAATC	qRT-PCR <i>um05311</i>
OAli17	um11060 RT fw	CAGAGCTCGTTCAGCATAAC	qRT-PCR <i>um11060</i>
OAli18	um11060 RT rv	CCTGTTGCGACCATACTTC	qRT-PCR <i>um11060</i>
OAli23	um12217 RT fw	CGTATTGTCCGCCTTGC	qRT-PCR <i>um12217</i>
OAli24	um12217 RT rv	CAGACGCCTCGAGAATG	qRT-PCR <i>um12217</i>
OAli29	um06223 RT fw	TGGCACCTTTGACGATCC	qRT-PCR <i>um06223</i>
OAli30	um06223 RT rv	AGTGTAGTGGTCCTCCTCTC	qRT-PCR <i>um06223</i>
OAli31	um05306 RT fw	TCCACAGACGGTCGTAAC	qRT-PCR <i>um05306</i>
OAli32	um05306 RT rv	CGCACACGATGTCCATTC	qRT-PCR <i>um05306</i>
OAli33	um01690 RT fw	GGCGTTCACCTTTGGTGAG	qRT-PCR <i>um01690</i>
OAli34	um01690 RT rv	GCGGGATGGGTTTAGTTG	qRT-PCR <i>um01690</i>
OAli35	um05318 RT fw	CCTTTGGCGGAACATACG	qRT-PCR <i>um05318</i>
OAli36	um05318 RT rv	AGGGTGAAACGGGTAGTG	qRT-PCR <i>um05318</i>
OAli43	05311lb_fw	TGATCGGGTGGCTCTTAATG	KO <i>um05311</i>
OAli44	05311lb_rv	GGCCATCTAGGCCGTTGGTGCAAGAC	KO <i>um05311</i>

		TCTC	
OAli45	05311rb_fw	GGCCTGAGTGGCCAGAGCATAGTTGG TCATATC	KO <i>um05311</i>
OAli46	05311rb_rv	CCGAGGCTTTCTGATCAC	KO <i>um05311</i>
OAli47	06127lb_fw	TCTTTGGCTCTCGAAGACTC	KO <i>um06127</i>
OAli48	06127lb_rv	GGCCATCTAGGCCAGCGTCGAGCAAA TC	KO <i>um06127</i>
OAli49	06127rb_fw	GGCCTGAGTGGCCTCGTGAGTACCAC GCTGATG	KO <i>um06127</i>
OAli50	06127rb_rv	GAAACACGGACACCATCCTAC	KO <i>um06127</i>
OAli51	10553lb_fw	AAAGTGTGGCGTCACATC	KO <i>um10553</i>
OAli52	10553lb_rv	GGCCATCTAGGCCCTGCCCGTGATTG ATCTTTG	KO <i>um10553</i>
OAli53	10553rb_fw	GGCCTGAGTGGCCATTGTTGAAGGT TGCGATTTAG	KO <i>um10553</i>
OAli54	10553rb_rv	GCAGTGCAAACAGGTAATGG	KO <i>um10553</i>
OAli55	11060lb_fw	GGGCGACATCTGATACAAC	KO <i>um11060</i>
OAli56	11060lb_rv	GGCCATCTAGGCCGACAAGAGGCCAG GCTGTG	KO <i>um11060</i>
OAli57	11060rb_fw	GGCCTGAGTGGCCTTGTTAATTCATGG TCCTTC	KO <i>um11060</i>
OAli58	11060rb_rv	CGACTTTGGTCGCCAAAGATG	KO <i>um11060</i>
OAli59	12217lb_fw	GTTCGTCAGCTCCACACTTC	KO <i>um12217</i>
OAli60	12217lb_rv	GGCCATCTAGGCCCTGGTCTCTTGAC TTTC	KO <i>um12217</i>
OAli61	12217_rv_fw	GGCCTGAGTGGCCGACAATGGCAGC TCGTGAT	KO <i>um12217</i>
OAli62	12217rb_rv	AACTGTCAGCGTCGAGCCTTGG	KO <i>um12217</i>
OAli63	12313lb_fw	CCGCAAGCATTGACAGATAG	KO <i>um12313</i>
OAli64	12313lb_rv	GGCCATCTAGGCCATACAGCGCGTGG TTTGGTG	KO <i>um12313</i>
OAli65	12313rb_fw	GGCCTGAGTGGCCTGCGCTTGCAAAC GTGTCC	KO <i>um12313</i>
OAli66	12313rb_rv	AGTGGGCATTCCGTAACGAG	KO <i>um12313</i>
OAli97	compl. KO01690_fw	TTAGCGGCCGCTCAGGCGTCCGGCTT GGG	Komplementation KO <i>um01690</i>
OAli98	compl. KO01690_rv	CATATGGTTGATGAGCTGACAGG	Komplementation KO <i>um01690</i>
OAli99	compl. KO12217_fw	GGCGGCCGCTTAGTTGCTGTCTTTTGT GTC	Komplementation KO <i>um12217</i>
OAR01	compl. KO2239_fw	GACCTGCAGGGTGTGCACGGTGCTAC TG	Komplementation KO <i>um02239</i>
OAR02	compl. KO2239_rv	GAGCGGCCGCCCCACTCGTACTGCT AC	Komplementation KO <i>um02239</i>
OAR05	um02239 RT fw	TCAGGTGCAAGGAGAAGG	qRT-PCR <i>um02239</i>
OAR06	um02239 RT rv	ACAGAATACTCCGCTTCCC	qRT-PCR <i>um02239</i>
OAR40	Y2H_see1_F w (without SP)	GCGCATATGCATCCTCTACAATCGTTT CG	Klonierung von see1 in pGBKT7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
OAR41	Y2H_see1_Rv (without SP)	CGCGGATCCTTACGTCGTCGGCCCAA ATT	Klonierung von see1 in pGBKT7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
ODA45	00154lb_fw	CGTGTTCGCTGTAGTTAAG	KO <i>um00154</i>
ODA46	00154lb_rv	GTTGGCCATCTAGGCCGCGAGGAGTA CGAGATCAG	KO <i>um00154</i>
ODA48	00154rb_fw	GTTGGCCTGAGTGGCCGTAGGGTTGC GTCATCATC	KO <i>um00154</i>
ODA51	03650lb_fw	CCTGCGTAGCCTCAAGAGTC	KO <i>um03650</i>
ODA52	03650lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCACCGGGAGAG GATCGGATAG	KO <i>um03650</i>

ODA53	03650rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCTCTCCGCTCT GGACTATACTACC	KO <i>um03650</i>
ODA54	03650rb_rv	CCAGGCTCCTCTTCTTTCTGAATC	KO <i>um03650</i>
Olex85	06222lb_fw	CTGCAAAC TAGCGTATCGCCTCTC	KO <i>um06222</i>
Olex86	06222lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCCGCAAACGC AATGATCGTTCC	KO <i>um06222</i>
Olex87	06222rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCGCATCTTGAA CCAGTGCTCTTGTC	KO <i>um06222</i>
Olex88	06222rb_rv	CTGCCAAGCTCCAAGTGTATCG	KO <i>um06222</i>
OLS1	compl. KO00154_fw (1kb)	GTCATATGCTTTGTCGCTTGTGGCGT G	Komplementation KO <i>um00154</i> (1kb)
OLS100	um05495 RT fw	TCAGCTGGAAGGGTAAGAC	qRT-PCR <i>um05495</i>
OLS101	um05495 RT rv	CTCGGGCTGCAATCTAAAG	qRT-PCR <i>um05495</i>
OLS102	um03650 RT fw	TCCACGTATCGTCGTCTG	qRT-PCR <i>um03650</i>
OLS103	um03650 RT rv	CATGGCTGCTTTGGGATAG	qRT-PCR <i>um03650</i>
OLS104	um06222 RT fw	GCCATCAGCTCCGTATTTCC	qRT-PCR <i>um06222</i>
OLS105	um06222 RT rev	TCATCGCAGGATGTCGTAG	qRT-PCR <i>um06222</i>
OLS106	um05439 RT fw	GACAACAATGGAGGCTCAAG	qRT-PCR <i>um05439</i>
OLS107	um05439 RT rv	CGGAAGCATTGGGAGAAC	qRT-PCR <i>um05439</i>
OLS108	um03046 RT fw	CTTCTGCGTAGACAAAGGAC	qRT-PCR <i>um03046</i>
OLS109	um03046 RT rv	GAAGAACTTGCCGGTTGG	qRT-PCR <i>um03046</i>
OLS118	See1(ohneSP)-pGreen- SPYNE- mCherry-Myc fw	GCGCGGATCCATGCATCCTCTACAATC GTTTC	Klonierung See1 in pGreen- SPYNE-mCherry für BiFC
OLS119	See1- (ohneSP)- pGreen- SPYNE- mCherry-Myc rv	GACTCGAGCGTCGTCGGCCCAAATTT	Klonierung See1 in pGreen- SPYNE-mCherry für BiFC
OLS120	SGT1- pGreen- SPYCE-CFP- HA fw	GSTATGGATCCATGGCCGCGTCGGATC TG	Klonierung SGT1 in pGreen- SPYCE-CFP für BiFC
OLS121	SGT1- pGreen- SPYCE-CFP- HA rv	GCTCTCGAGGATTCCCTGAATGACTTT G	Klonierung SGT1 in pGreen- SPYCE-CFP für BiFC
OLS122	compl. KO1829_fw	GTCATATGGCAGCTCAGCTCACTTCC	Komplementation KO <i>um01829</i>
OLS123	compl. KO1829_rv	GATAGCGGCCCGCCGCTTTCAAGCAAC CTTG	Komplementation KO <i>um01829</i>
OLS124	Y2H see1 conserved domain fw	GCGCGCATATGAAGCAGAAGCACAAG ATC	Klonierung von see1 (konservierte Region) in pGBKT7 für Hefe-Zwei-Hybrid- Analyse
OLS125	Y2H see1 conserved domain rv	GCGCGGATCCTTACTTGGTGGTGATGT TTTG	Klonierung von see1 (konservierte Region) in pGBKT7 für Hefe-Zwei-Hybrid- Analyse
OLS126	Y2H see1 C- Terminus fw	GCGCATATGAGCATCGAGCTGTTCGA G	Klonierung von see1 (C- Terminus) in pGBKT7 für Hefe- Zwei-Hybrid-Analyse

OLS130	Y2H SGT1 full length fw	GTATATACCCGGAATGGAGTACCCAT ACGAC	Klonierung von SGT1 in pGAD7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
OLS131	Y2H SGT1 full length rv	GCGCGGATCCTCAAATTTCCCACTTCT TG	Klonierung von SGT1 in pGAD7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
OLS135	compl. KO5439_fw	CGCATATGCTGCGCTATGCCCAAGTC	Komplementation KO <i>um05439</i>
OLS136	compl. KO5439_rv	GTATGCGGCCGCGATCTTTTGCGGAC GATC	Komplementation KO <i>um05439</i>
OLS137	compl. KO3650_fw	CGCATATGGCAATCGATCCAAGGAGA G	Komplementation KO <i>um03650</i>
OLS138	compl. KO3650_rv	CTATGCGGCCGCGTTGATCAAAGAGG CATG	Komplementation KO <i>um03650</i>
OLS139	Y2H SGT1 CS-Domäne fw	CGCGCGCGCGCATATGAAACCTAAATA TAGGCATG	Klonierung von SGT1 (CS-Domäne) in pGAD7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
OLS144	Y2H SGT1 CS-Domäne rv	GGATCCCTACTCAGCTTTTGCAAGGCG	Klonierung von SGT1 (CS-Domäne) in pGAD7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
OLS145	Y2H SGT1 SGS-Domäne fw	CGGCGCGCGCATATGATGAAGTCAAA AAAGGACTGG	Klonierung von SGT1 (SGS-Domäne) in pGAD7 für Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse
OLS147	See1(ohneSP)-Myc-pGreenII0029 fw	GCCGGCTCTAGATGCATCCTCTACAAT CGTTTC	Klonierung See1-Myc in pGreenII0029 für CoIP
OLS148	See1(ohneSP)-Myc-pGreenII0029 rv	GGCCGCGAGCTCTTAAAGATCCTCCTC AGAAATCAACTTTTGCTCCGTCGTCGG CCCAAATTTATACTCTCC	Klonierung See1-Myc in pGreenII0029 für CoIP
OLS149	SGT1+HA-pGreenII0029 fw	CATCTAGATGGCCGCGTCCGGATCTG	Klonierung SGT1-HA in pGreenII0029 für CoIP
OLS152	SGT1+HA-pGreenII0029 rv	CCGGCCGGCGGATCCTTAAAGCGTAAT CTGGAACATCGTATGGGTAAATTTCCC ACTTCTTGAG	Klonierung SGT1-HA in pGreenII0029 für CoIP
OLS158	um01829-pET15b fw	CGCATATGGCCACTCTGCCTCAGAAG	Klonierung von um01829 in pET15b für Expression in <i>E. coli</i>
OLS159	um01829-pET15b rv	CATAGGATCCTCAAGCAACCTTGACG C	Klonierung von um01829 in pET15b für Expression in <i>E. coli</i>
OLS160	um01829-p123-mCherry fw	GCCATATGGCGTTGTGGGTCTAATAGC	Klonierung von um01829 in p123-mCherry für Sekretion/Lokalisation
OLS161	um01829-p123-mCherry rv	CATATAATTTCCCGGAGCAACCTTGGA CGCAGG	Klonierung von um01829 in p123-mCherry für Sekretion/Lokalisation
OLS162	Mut. PCR mit um01829	GAATCCAACCTTGTGGGTGAGCGGTGG GTTGCTCTGGCGTG	Mutagenese PCR mit um01829
OLS163	Mut. PCR mit um01829	CTTATCGAGCCACTGCGAG	Mutagenese PCR mit um01829
OLS165	Mut. PCR mit um01829	CGAGCTGACACAAGTTTC	Mutagenese PCR mit um01829
OLS166	Mut. PCR mit um01829 (aa:410-412 gne zu aaa)	GTTTCAGGCCTTCTCATTGCGGCGGC GGGTGGACTCAACCCTGCC	Mutagenese PCR mit um01829 (AS:410-412 GNE zu AAA)
OLS167	Mut. PCR mit um01829 (aa:499 e zu a)	CACCATCTTCTACAACATGGCGTTTGC CGTCATCAACTCGGGC	Mutagenese PCR mit um01829 (AS:499 E zu A)
OLS168	um01829-pRSET-GST-PP fw	CATACCATGGAATGGCCACTCTGCCTC AGAAG	Klonierung von um01829 in pRSET-GST-PP für Expression in <i>E. coli</i>
OLS169	um01829-pRSET-GST-PP rv	GCGAATTCTCAAGCAACCTTGACGC	Klonierung von um01829 in pRSET-GST-PP für Expression in <i>E. coli</i>
OLS172	um01829-pPic9 fw	CGCCGGGTACCCATACGATGTTCCA GATTACGCTTACCCATACGATGTTCCA GATTACGCTTACCCATACGATGTTCCA	Klonierung von um01829 in pPic9 für Expression in <i>P. pastoris</i>

GATTACGCTGCCACTCTGCCTCAGAAG			
OLS173	um01829 in pPic9 rv	GAATTCTCAAGCAACCTTGGACGC	Klonierung von um01829 in pPic9 für Expression in <i>P. pastoris</i>
OLS2	compl. KO00154_rv (1kb)	CAGCGGCCGCGTGGTCTATAGCTTGGCG	Komplementation KO <i>um00154</i> (1kb)
OLS34	compl. KO00154mitum00153_fw (2kb)	GTCATATGGGTGGCCAAAGATCCAGAG	Komplementation KO <i>um00154</i> mit <i>um00153</i> (2kb)
OLS35	compl. KO00154mitum00153_rv (2kb)	ATGCGGCCGCTAGACGCCGTTGGGGTG	Komplementation KO <i>um00154</i> mit <i>um00153</i> (2kb)
OLS38	00154rb_rv	CGGATAGTGAGTGCATCC	KO <i>um00154</i>
OLS39	compl. KO00154_fw (2kb)	GTCATATGCGAGAATAGCAGTCGAGG	Komplementation KO <i>um00154</i> (2kb)
OLS60	um00154-Insertion lb rv	CAGGCCATCTAGGCCGATGCTGCCTGTACTGCACAGG	Insertion <i>um00154</i>
OLS61	um00154-Insertion rb fw	CAGGCCTGAGTGGCCGTACCAGAACGATCTGGACTGG	Insertion <i>um00154</i>
OLS62	um00154-Insertion rb rv	GCACGATGGAAGACCGG	Insertion <i>um00154</i>
OLS63	00154lb_fw (mitFRT)	CCGTTTCACAGTCGATCC	KO <i>um00154</i> mit FRT sites
OLS64	00154lb_rv (mitFRT)	CTGGCCATCTAGGCCGCTATCAACCAACGTCGGCC	KO <i>um00154</i> mit FRT sites
OLS65	00154rb_fw (mitFRT)	CTGGCCTGAGTGGCCACAAAAGGAGTAGGG	KO <i>um00154</i> mit FRT sites
OLS66	00154rb_rv (mitFRT)	GGATACCGTATCCGCATTC	KO <i>um00154</i> mit FRT sites
OLS67	um00154-p123 mit pit2-Promotor fw	GTCCGCGGATGCTGCCGAACATTGCC TT	Überexpression von <i>um00154</i> durch pit2-Promotor
OLS68	um00154-p123 mit pit2-Promotor rv	CAGCGGCCGCTATAGCTTGGCGATGTAG	Überexpression von <i>um00154</i> durch pit2-Promotor
OLS75	um00154 RT fw	TGCGAGCTACTACATGTGTC	qRT-PCR <i>um00154</i>
OLS76	um00154 RT rv	CACGGCAGGTCATTGTTATC	qRT-PCR <i>um00154</i>
OLS79	um00153 RT fw	GTTTCGCCAAGCACTAGC	qRT-PCR <i>um00153</i>
OLS80	um00153 RT rv	ATGCGAACCGAACCTGAG	qRT-PCR <i>um00153</i>
OLS90	um05223 RT fw	CGCTTTCAGAGGCATGAC	qRT-PCR <i>um05223</i>
OLS91	um05223 RT rv	TCGGTGGAAGCATCTGAG	qRT-PCR <i>um05223</i>
OLS92	um11763 RT fw	GGATGCGGTCATCAACTTC	qRT-PCR <i>um11763</i>
OLS93	um11763 RT rv	CTTCTTGTCGGGAGTTTCG	qRT-PCR <i>um11763</i>
OLS96	um1130 RT fw	AGGCCATAGACGCATCAG	qRT-PCR <i>um01130</i>
OLS97	um1130 RT rv	TCGAACAAGCCGTAGAGG	qRT-PCR <i>um01130</i>
OLS98	um01829 RT fw	CCCTCGAGAAGCAGCCTATC	qRT-PCR <i>um01829</i>
OLS99	um01829 RT rv	CCTTGGACGCAGGAGTCTTG	qRT-PCR <i>um01829</i>
OZA10	02239rb_rv	CTTCGACCTTACGGCATC	KO <i>um02239</i>
OZA13	06223lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCCGGTGATGAGTCAAGAAG	KO <i>um06223</i>

OZA14	06223lb_fw	GCGTTTGGTGGCATTAG	KO um06223
OZA15	06223rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCGTTCTCTGG ACTTCTGC	KO um06223
OZA16	06223rb_rv	AGACGCTGGCCTAGACAA	KO um06223
OZA19	05223lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCGAAGCGATGC GAGTTGGA	KO um05223
OZA20	05223lb_fw	ACACGAATGCACCTCATC	KO um05223
OZA21	05223rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCCATGGTCATA CCTGTCAC	KO um05223
OZA22	05223rb_rv	CGATGAAAGGGTGCAGAT	KO um05223
OZA25	05306lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCAAGTGCCTCT TGGTGTG	KO um05306
OZA26	05306lb_fw	AATTGCCACCACTTCCTC	KO um05306
OZA27	05306rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCCGCACTACCT TGAACAGC	KO um05306
OZA28	05306rb_rv	TGCCCTCACATTCTGCTT	KO um05306
OZA31	11763lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCTTCTTAGGGG GAAGGAGG	KO um11763
OZA32	11763lb_fw	CATGAAGTGGGTGAGTCG	KO um11763
OZA33	11763rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCATACTGTCCTT CGCTGAG	KO um11763
OZA34	11763rb_rv	AGCATCCTCACTTGCATC	KO um11763
OZA43	01130lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCATACACTACG CTACCGC	KO um01130
OZA44	01130lb_fw	TTGGCAGCGCATCCGAA	KO um01130
OZA45	01130rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCATAGACCCGC CATGAATC	KO um01130
OZA46	01130rb_rv	GAGGAGATTGCCAAGATG	KO um01130
OZA49	01829lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCGATGAGGGGG AATACCTG	KO um01829
OZA50	01829lb_fw	CTGAAGCGCGAAATCTTG	KO um01829
OZA51	01829rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCGTATCGCATT GCATCGAC	KO um01829
OZA52	01829rb_rv	TTGCCTCGACTGAGTGAC	KO um01829
OZA7	02239lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCGATGTTTTGCG AGCGAAG	KO um02239
OZA8	02239lb_fw	TCGGAAACCGTTCTGAGC	KO um02239
OZA9	02239rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCAGTAGCAGTC ACGAGTGG	KO um02239
/	01690lb_fw	TTCAGATACGAGAAGAAGCGAACAGC	KO um01690
/	01690b_rv	CACGGCCTGAGTGGCCCACGACACGG CTCAGATTCATCAC	KO um01690
/	01690rb_fw	GTGGGCCATCTAGGCCGTCCTGACAG GGAAGCTCCTCTCG	KO um01690
/	01690rb_rv	TCACCAACTACAACCTCGGTAAATCC	KO um01690
/	05318lb_fw	GACGCTTCTCACCTCAACAATTGC	KO um05318
/	05318lb_rv	GTGGGCCATCTAGGCCGAGTGAAGCT AACGGACTAAGATGC	KO um05318
/	05318rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCGAGTTCTAG TATCAGCACCAATTGC	KO um05318
/	05318rb_rv	CCGTGATTCCAACTGTCTCTGC	KO um05318
/	05439lb_fw	GAGCTCGATCGCTGTCTTTG	KO um05439
/	05439lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCCTGCAGACTGG ATCTGCTTGAAC	KO um05439
/	05439rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCATGGTTGCGA GGGAGAACAAGAG	KO um05439

/	05439rb_rv	TGCGCTATGCCCAAGTCTATACG	KO <i>um05439</i>
/	05495lb_fw	GGCGTGGTTGCAAGATACGG	KO <i>um05495</i>
/	05495lb_rv	TTCGGCCATCTAGGCCGACAAGGGCG TCTTGATGG	KO <i>um05495</i>
/	05495rb_fw	CACGGCCTGAGTGGCCAAACGCACGA AGCGGAAGAAGTAG	KO <i>um05495</i>
/	05495rb_rv	AGTGACGAGAACAAGGAAGTTCAG	KO <i>um05495</i>

Abgrenzung der Eigenleistung

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden von mir selbstständig und ohne andere als die hier aufgeführte Hilfe durchgeführt. Dabei erfolgte die Konzipierung der Experimente in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Prof. Dr. Gunther Döhlemann. Im Folgenden werden weitere, an dieser Arbeit beteiligte Personen sowie deren experimentelle Beiträge genannt:

Alexandra Matei und Amey Redkar

waren im Rahmen ihrer Promotionen an der in den Kapiteln 2.1 und 2.2 beschriebenen Selektion und Charakterisierung der vorgestellten organspezifischen Kandidaten beteiligt.

Amey Redkar

hat im Rahmen seiner Promotion mit See1 eine Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse mit einer normalisierten cDNA-Bank von infiziertem Pflanzenmaterial durchgeführt und identifizierte ein Maishomolog von SGT1 (*supressor of G2 allele of skp1*) als Interaktionspartner von See1.

Amy Klemd

hat im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die in Abbildung 18 dargestellte Appressorienbildung und Penetrationseffizienz der Deletionsmutante SG200 Δ um01829 ermittelt und war an der mikroskopischen Lokalisationsanalyse von Um01829 (Abb. 19 A) beteiligt.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich im Laufe meiner Promotion unterstützt und somit zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht diesbezüglich an Gunther Döhlemann, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner AG anfertigen zu dürfen sowie für die gute Betreuung in den letzten drei Jahren.

Des Weiteren möchte ich den Mitgliedern meiner Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer, Herrn Prof. Dr. Michael Bölker und Herrn Prof. Dr. Martin Thanbichler danken. Diese haben mir ebenfalls sehr hilfreich im Rahmen meiner jährlichen „Thesis Advisory Committee Meetings“ zur Seite gestanden, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte. Herrn Prof. Dr. Michael Bölker danke ich zudem für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein riesen Dankeschön geht an meinen „Bench-Nachbarn“ Amey, für die schöne Zeit die wir im Labor sowie privat miteinander verbracht haben. Ebenso möchte ich mich bei meiner Kollegin Dani und bei meinem ehemaligen Kollegen Alex für die intensive Unterstützung im Labor besonders zu Beginn meiner Promotion bedanken. Alex und Elaine danke ich darüber hinaus für das geduldige und sehr sehr hilfreiche Korrekturlesen meiner Dissertation.

Mein Dank gilt natürlich auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung für organismische Interaktionen, für ihre Hilfsbereitschaft, sowie für viele sehr nützliche Diskussionen. Diesbezüglich möchte ich mich besonders bei Ria, Anita und Stefan bedanken, die den Laboralltag um einiges erleichtern haben.

Meiner ganzen Familie, insbesondere meiner Mutter, danke ich dafür, dass sie immer hinter mir stehen und stets ein offenes Ohr für mich haben.

Der größte Dank gilt meinem Freund Marcus, der mir durch seine Liebe, sowie viele motivierende Worte und dadurch, dass er immer an mich glaubt und für mich da ist, viel Kraft gegeben hat.

Lebenslauf

Lena Schilling

geboren am 25.04.1986 in Offenbach am Main

Akademische Ausbildung

12/2011 - heute	Promotion im Bereich Biologie Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie Marburg Abteilung: Organismische Interaktionen Arbeitsgruppe: Prof.Dr.Gunther Döhlemann Projekt: Identifizierung und Charakterisierung organspezifischer <i>Ustilago maydis</i> Effektoren
10/2009 - 11/2011	Master of Science Agrobiotechnology Justus-Liebig-Universität, Gießen
10/2005 - 10/2009	Bachelor of Science Ökotoxologie Justus-Liebig-Universität, Gießen

Schulische Ausbildung

08/2002 - 08/2005	Allgemeine Hochschulreife: Rudolf-Koch-Schule Offenbach am Main
08/1996 - 08/2002	Mittlere Reife: Marienschule Offenbach am Main
08/1992 - 08/1996	Grundschule: Markwaldschule Mühlheim am Main

Praktische Abschlussarbeit und Praktika

05/2011 - 11/2011	Masterarbeit: Sanofi Deutschland GmbH, Frankfurt am Main Abteilung: R&D LGCR/Parallel Synth. & Natural Prod. FF Projekt: Aktivierung stiller Gene ausgewählter Actinomyceten
09/2009 - 02/2010	Ministry of Agriculture, Windhoek/Namibia
08/2009 - 09/2009	University of Namibia, Windhoek/Namibia Faculty of Agriculture and Natural Resources Department of Food Science and Technology
03/2008 - 07/2008	Apetito AG, Rheine Bereich: Qualitätssicherung / Mikrobiologie

Publikationen

Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V. and Doehlemann, G. (2014), **Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors.** Molecular Plant Pathology. doi: 10.1111/mpp.12133

Redkar A., Schilling, L., Hoser, R., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, V. and Doehlemann, G (2014), **A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* is Required to Guide Host Cells to Form Tumors in Maize Leaves.** The Plant Cell (in Revision)

