

Expert's view: Pathogen-Pflanze-Interaktionen

Ustilago maydis: ein faszinierendes Modellsystem für pathogene Pilze

REGINE KAHMANN

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRISCHE MIKROBIOLOGIE, MARBURG

In this article I will review how over a period of about 70 years the advancement of new technologies has catapulted the odd fungus *Ustilago maydis* causing a strange disease in maize to surface as one of the most accessible systems to understand biotrophic eukaryotic plant pathogens molecularly. The *U. maydis*-maize interaction system allows fundamental insights into the intricacies of what it takes to infect a plant successfully, to modulate its metabolism so that it serves fungal needs and at the same time provides an environment that allows the fungus to undergo morphological transitions and complete its sexual life cycle.

DOI: 10.1007/s12268-024-2171-4

© Die Autorin 2024

■ Als ich 1982 beschloss, mit dem Brandpilz *Ustilago maydis* zu arbeiten, war das System klassisch-genetisch voll erschlossen. Robin Holliday and David Perkins, zwei Pioniere der Pilzgenetik, hatten mit diesem Basidiomyceten gearbeitet. Hauptgrund war, dass *U. maydis* in seiner haploiden Hefeform kompakte Kolonien auf Festmedien bildet. Dies erleichterte die Identifizierung von auxotrophen Mutanten, denn man konnte die Kolonien mit einem Samtkissen auf verschiedene Festmedien stempeln. Die genetische Kartierung auxotropher Mutanten kulminierte letztendlich in einer wegweisenden Publikation, in der R. Holliday das später nach ihm benannte Holliday-Modell für Genkonversion und Rekombination postulierte. Für mich war neben der genetischen Zugänglichkeit jedoch ausschlaggebend, dass *U. maydis* auch der Erreger der Beulenbrand-Krankheit von Mais ist (**Abb. 1A**). Hierbei entstehen lokal begrenzt an oberirdischen Teilen der Pflanze große, tumorartige Gebilde, die riesige Mengen Brandsporen enthalten. Die Krankheit ist weltweit verbreitet und führt je nach Witterungsbedingungen zu erheblichen Ernteaussfällen. *U. maydis* ist ein biotropher Pilz, der seinen Wirt nicht abtötet, sondern eine enge Interaktion mit seiner Wirtspflanze eingeht, in der von der Pflanze mit Nährstoffen versorgt wird. Nach Fusion kompatib-

ler haploider Zellen auf der Blattoberfläche entsteht ein dikaryotisches Filament, das durch Spitzenwachstum, Vakuolisierung älterer Teile und Einziehen von Septen gekennzeichnet ist und Infektionsstrukturen ausbildet. Die Penetration der pflanzlichen Zellwand erfolgt vermutlich durch kurzzeitige lokale Sekretion zellulolytischer Enzyme. Bei diesem Vorgang stülpt sich die Plasmamembran der Pflanze aus und umhüllt die intrazelluläre Hyphe komplett, d. h. diese kommt nie in Kontakt mit dem Zellplasma der Wirtszelle. Es erfolgt eine längere Phase der Vermehrung als Dikaryon mithilfe eines Schnallenmyzels, das die Weitergabe der beiden unterschiedlichen Zellkerne gewährleistet (**Abb. 1B–D**). Ca. 3–4 Tage nach Infektion kommt es zur Karyogamie und nachfolgend zu massiver mitotischer Proliferation des Myzels vorwiegend in Aggregaten in Zellzwischenräumen und zur Induktion der Tumore. In dem hypertrophierten Pflanzengewebe erfolgt die Entwicklung der abgerundeten, stark melanisierten, diploiden Brandsporen. Letztere werden nach Aufplatzen des Tumorgewebes freigesetzt. Unter geeigneten Bedingungen keimen sie zu einem Promyzel aus, es erfolgt die Meiose und von dem segmentierten Promyzel schnüren sich haploide Zellen ab, die nach Erkennung eines passenden Kreuzungspartners einen neuen Infektions-

zyklus beginnen können. Schon in den 50er- und 60er-Jahren war etabliert worden, dass die sexuelle Entwicklung von *U. maydis* untrennbar mit der pathogenen Entwicklung gekoppelt ist, d. h. ohne Infektion der Pflanze kann *U. maydis* seinen Lebenszyklus nicht vollenden [1]. Das schürte die Hoffnung, dass ein Verstehen der sexuellen Entwicklung gleichzusetzen wäre mit einem Verständnis der pathogenen Entwicklung. Deshalb wird dies der Fokus dieses Expert's view's sein.

Das genetische Zeitalter der pathogenen Entwicklung

In wegweisenden genetischen Arbeiten zur Pathogenität von James E. DeVay, John E. Puhalla, Robin Holliday, Sandra L. Anagnostakis, Flora Banuett und Ira Herskowitz wurde gezeigt, dass die haploide Hefeform von *U. maydis*, die sich durch Knospung vermehrt, nicht infektiös ist und dass die pathogene Filamentform erst nach Fusion kompatibler haploider Stämme entsteht (**Abb. 1B**). Filamentbildung ließ sich eindrucksvoll auf synthetischen Medien, denen Aktivkohle zugesetzt wurde, nachweisen. Fusion, Filamentbildung und nachfolgende pathogene Entwicklung werden vom *a*- und *b*-Locus kontrolliert. Während vom *a*-Locus nur zwei Allele, *a1* und *a2*, bekannt sind, ist der *b*-Locus multiallelisch. Das pathogene Entwicklungsprogramm wird nur von Kombinationen haploider Stämmen initiiert, die sich in *a* und *b* unterscheiden. Die Analyse diploider Stämme mit identischen oder verschiedenen *a*- und *b*-Allelen zeigte, dass unterschiedliche *a*-Loci nicht für die pathogene Entwicklung nötig sind, d. h. Unterschiede in *a* sind nur wichtig, wenn Zellen fusionieren müssen. Diploide, heterozygot für *a*- und homozygot für *b*-Stämme, sind hingegen hefeartig und nicht pathogen. Damit konnte dem *b*-Locus die zentrale Aufgabe bei Filamentbildung und pathogener Entwicklung zugeschrieben werden und darüber hinaus postuliert werden, dass die Erkennung von identischen bzw. nicht identischen *b*-Allelen intrazellulär erfolgen muss. Für einschlägige Literatur siehe [2].

Das molekulare Zeitalter der pathogenen Entwicklung

Zu Beginn der 80er-Jahre begannen die Gruppen von Flora Banuett und Ira Herskowitz, Sally Leong und mir mit Experimenten zur Klonierung des *b*-Locus. Die Strategie war vorgegeben: Ein diploider *a1/a2*-, *b1/b1*-Stamm sollte nach Transformation mit einer Genbank aus einem *b2*-Stamm filamentös und pathogen werden, wenn der *b2*-Locus aufgenommen wurde. Voraussetzung war jedoch ein funktionierendes Transformationsprotokoll. Dies konnte 1988 mit linearisierter DNA und Verwendung des *U. maydis*-eigenen *hsp70*-Promotors in Kombination mit dem bakteriellen Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen in der Gruppe von S. Leong etabliert werden. Damit konnte die Strategie zur Klonierung des *b*-Locus erfolgreich umgesetzt werden. Der komplementierende Bereich enthielt den codierenden Bereich für das *b*-Protein, und unterschiedliche Allele zeigten variable N-terminale Regionen, gefolgt von einer Homeodomäne und einer konstanten C-terminalen Region. Damit war klar, dass das *b*-Protein ein regulatorisches Protein sein muss und Erkennung von Selbst bzw. Nichtselbst vermutlich durch Assoziation reguliert werden (siehe [2]). Allerdings zeigten Mutanten, in denen interne Bereiche des *b*-Gens deletiert waren, keinen Phänotyp, was genetische Redundanz vermuten ließ. Dies bewahrheitete sich durch Entdeckung eines zweiten Gens im *b*-Locus (*bW*, *bWest*), das ebenfalls für ein Homeodomänenprotein codiert. Das *bW*-Gen ist divergent zum ursprünglich klonierten *b*-Gen (nachfolgend *bE*, *bEast* genannt) angeordnet und nur durch eine kurze intergenische Region von diesem getrennt. Der Aufbau der *bW*-Proteine ähnelt denen von *bE* mit variabler Domäne am N-Terminus, Homeodomäne und konstanter Domäne. Die *bE1*- und *bW1*-Proteine vom gleichen *b*-Allel sind inaktiv, im Dikaryon eines *b1/b2*-heterozygoten Stamms entstehen hingegen zwei äquivalente aktive *bE/bW*-Kombinationen, *bE1/bW2*, und *bE2/bW1* (**Abb. 1B, C**, [3]). Nachfolgende Arbeiten zeigten, dass die *bE/bW*-Proteinkombinationen, die Aktivität zeigen, dimerisieren, während *bE/bW*-Proteine vom gleichen Allel dies nicht können (**Abb. 1B, C**, [4]).

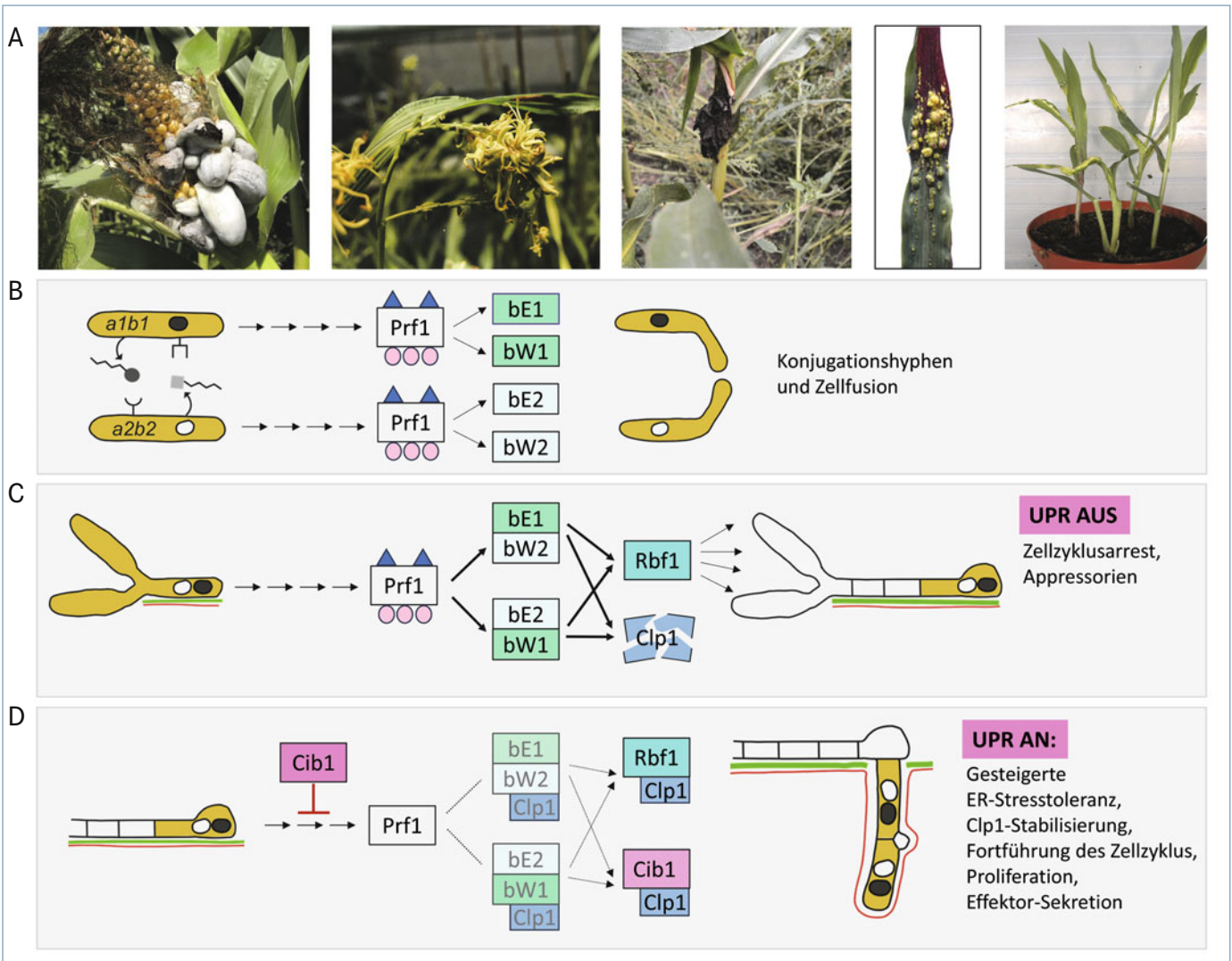
Anfang der 90er-Jahre gelang auch die Klonierung des *a*-Locus in den Gruppen von Sally A. Leong und mir. Es stellte sich

heraus, dass *a1* und *a2* nicht homologe DNA-Abschnitte enthalten, die durch konservierte Genombereiche flankiert werden. Mittels Sequenzierung und funktionaler Tests gelang der Nachweis, dass *a1* und *a2* für Lipopeptid-Mating-Pheromone und 7-Transmembranrezeptoren codieren, d. h. hierüber Zell-Zell-Erkennung und Zellfusion kompatibler Stämme kontrollieren (siehe [2]; **Abb. 1B**).

Mit dem Wissen über die Funktion der *a*- und *b*-Loci konnten solopathogene haploide Stämme konstruiert werden, die ein aktives *bE/bW*-Heterodimer bilden [5]. Solche Stämme sind ohne Kreuzungspartner pathogen. Dies halbierte bei reverser Genetik den Aufwand, weil Mutationen nicht mehr in kompatible Stämme eingeführt werden mussten. Solopathogene haploide Stämme entstanden auch durch Aminosäure-Substitutionen in der variablen Domäne von *bE2*, die zu Dimerisierung mit *bW2* führten, d. h. Selbsterkennung erlaubten. Dies führte zu dem Modell, dass die variablen Domänen über mehrere hydrophobe und polare linear angeordnete Kontaktpunkte dimerisieren, wenn sie von unterschiedlichen Allelen abstammen, in Proteinen vom gleichen Allel die Kontaktpunkte hingegen nicht zueinander passen [4]. Solche mutierten solopathogenen Stämme wurden auch als Zwischenstufe für die Entstehung neuer Allele angesehen – allerdings wurden sie nie aus der Natur isoliert – vermutlich, weil solche Stämme weniger Sporen produzieren und damit gegenüber Kreuzungen kompatibler Stämme einen Selektionsnachteil haben. Damit blieb die Entstehung der vielen natürlichen Allele des *b*-Locus lange ein Mysterium. Erst 2020 gelang es durch Sequenzierung aller 19 natürlich vorkommender Allele zu zeigen, dass viele Allele Signaturen von Rekombinationsereignissen aufweisen: Die Rekombinationsbruchpunkte liegen auf der einen Seite im variablen Bereich von *bW* und auf der anderen Seite im variablen Bereich von *bE*, d. h. auf Proteinebene innerhalb der Dimerisierungsdomänen beider Proteine [6]. Durch den gleichzeitigen Austausch nicht interagierender Domänen konnten so ohne Zwischenstufe neuartige *bE*- und *bW*-Hybridproteine entstehen, die keine Selbsterkennung zeigen, aber Nichtselbsterkennung erlauben. Leider ist es bislang aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht gelungen, die struk-

Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 1:** Die Schritte von der Fusion kompatibler Zellen bis zur Tumorbildung durch *Ustilago maidis* auf und in Maispflanzen. **A**, Tumorbildung im Kolben, in der männlichen Blüte, am Stamm, an Blättern und an Maiskeimlingen unter Laborbedingungen (6 Tage nach Infektion). **B**, Kontrolle der Fusion kompatibler haploider Zellen nach gegenseitiger Pheromonstimulation auf der Blattoberfläche. Die genetisch verschiedenen Zellkerne der haploiden, hefeartigen Zellen sind durch schwarze und weiße Ovale symbolisiert. bE- und bW-Proteine vom gleichen Allel dimerisieren nicht. Die durch Bindung des Pheromons induzierte MAP-Kinase-Kaskade und cAMP-Signaling führen zur dualen Phosphorylierung des Pheromon-Responsefaktors Prf1, der die Pheromon- und Rezeptorgene im *a*-Locus sowie die *b*-Gene induziert. Daneben existiert ein Prf1-unabhängiger Signalweg, der die Bildung von Konjugationshyphen kontrolliert. **C**, Nach Zellfusion auf der Blattoberfläche entsteht ein filamentöses Dikaryon, das Spitzenwachstum zeigt und in dem im hinteren Bereich vakuolisierte Bereiche durch Septen abgetrennt werden, bE- und bW-Proteine unterschiedlicher Allele dimerisieren. Diese aktiven bE/bW-Dimere induzieren eine Regulationskaskade. *rbf1* und *clp1* sind direkte Targets der aktiven bE/bW Heterodimere. Das b-induzierte Clp1-Genprodukt ist instabil. Das filamentöse Dikaryon ist Zellzyklus-arretiert. An der Hyphenspitze bildet sich eine verdickte Infektionsstruktur, das Appressorium. **D**, Nach Penetration der Pflanzenoberfläche kommt es zur Induktion der UPR (*unfolded protein response*). Durch unkonventionelles zytoplasmatisches Spleißen entsteht der zentrale Transkriptionsfaktor der UPR, Cib1. Cib1 stabilisiert das Clp1-Protein und inhibiert die Pheromonkaskade. Das stabilisierte Clp1 bindet an bW und Rbf1 und vermittelt hierüber eine Umsteuerung der bE/bW-Regulationskaskade und die Aufhebung des Zellzyklusarrests [2, 7, 17]. Blattoberfläche: grüne Linie; pflanzliche Plasmamembran: rote Linie; blaue Dreiecke: Phosphorylierung durch MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6; rosa Kreise: Phosphorylierung durch die PKA des cAMP-Signalwegs.

turelle Basis für 342 unterschiedliche Arten ein Heterodimer zu bilden aufzuklären bzw. sichtbar zu machen, warum das für 19 bE/bW-Kombinationen nicht möglich ist.

Mithilfe regulierbarer Promotoren konnten auch haploide Stämme konstruiert werden, in denen die Expression eines aktiven bE/bW-Heterodimers induzierbar wurde, und hierüber gelang es später mittels Transkriptom-

analysen nachzuweisen, dass >300 Gene durch das aktive bE/bW-Heterodimer reguliert werden. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Mehrzahl dieser Gene keine direkten Targets von bE/bW sind, sondern durch Rbf1, einen direkt von b abhängigen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, reguliert werden. Rbf1 ist auch maßgeblich dafür verantwortlich, dass im Dikaryon auf der Blattober-

fläche ein Zellzyklusarrest induziert wird. Zu den Rbf1-unabhängig bE/bW-regulierten Genen gehört Clp1, ein Protein, das für Vermehrung des Dikaryons in der Pflanze über Schnallenbildung essenziell ist. Das heißt, das bE/bW-Heterodimer steht an der Spitze einer komplexen Regulationskaskade, über die nach Penetration die UPR (*unfolded protein response*) massiv eingreift, um den Zellzyklusarrest

aufzuheben und Sekretion von Proteinen zu begünstigen (siehe [7], **Abb. 1B–D**).

Die Zeit nach 2006 und der Fokus auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis*

Die Erkenntnis, dass es *U. maydis*-Gene gibt, die exklusiv für die pathogene Entwicklung sind, ergab sich aus der Genomsequenz [5]. Diese hatte gezeigt, dass das Genom mit 20,5 Mb und 6.900 Protein-codierenden Genen relativ klein und kompakt ist und nur wenig repetitive DNA enthält. Zellwand-degradierende Enzyme, die eine Signatur aggressiver Pilze darstellen, waren zahlenmäßig stark dezimiert, was perfekt zur biotrophen Lebensweise von *U. maydis* passte. Beim Versuch, Pathogenitätsdeterminanten zu identifizieren fiel auf, dass das vorhergesagte Sekretom zu >50 % neuartige Proteine umfasst, dass fast 20 % der entsprechenden Gene in Clustern im Genom vorliegen und diese Gencluster im Tumorgewebe exprimiert sind – aber nicht, wenn *U. maydis* in axenischer Kultur angezogen wird. Dies erin-

nerte an Pathogenitätsinseln pathogener Bakterien – zumal Deletionsmutanten dieser Cluster in 50 % der Fälle einen Virulenzphänotyp aufwiesen, während außerhalb der Pflanze keinerlei phänotypische Auswirkungen auftraten [5]. Damit verlagerte sich das Interesse hin zu diesen neuartigen Effektorproteinen und der Aufklärung ihrer Funktion. Wie bereits aus anderen Pathosystemen bekannt, dienen sekretierte Effektoren dazu, die PAMP-induzierte pflanzliche Abwehr zu unterdrücken. *U. maydis* nutzt hierfür sowohl apoplastische als auch translozierte Effektoren, z. B. dient Pep1 als Inhibitor apoplastischer Peroxidasen, Pit2 inhibiert apoplastische Cysteinproteasen und Rsp3 bindet an die pilzliche Zellwand und schützt vor antimikrobiellen Molekülen der Maispflanze. Zu translozierten Effektoren gehört Cmu1, eine Chorismatmutase, die in der Maiszelle eine Umsteuerung des Metabolismus durch Erniedrigung von Salizylat bewirkt, dem wichtigsten Verteidigungshormon gegenüber biotrophen Pilzen. Ebenfalls transloziert wird Tin2, ein Effektor, der die Biosynthese

von Anthocyan induziert, was negative Auswirkungen auf Lignifizierung und positive Auswirkungen auf die Ausbreitung pilzlicher Hyphen im Gewebe hat (für einschlägige Literatur zu Effektoren siehe [8, 9]). Die Arbeiten zu Effektoren wurden maßgeblich beeinflusst durch duale, zeitlich aufgelöste Transkriptionsanalysen von *U. maydis* und Mais sowie Transkriptanalysen verschiedener infizierter Maisorgane. Diese Arbeiten haben gezeigt, dass die Expression der Effektorgene zeitlich gestaffelt erfolgt und mit der Entwicklung des Pilzes einhergeht, d. h. es gibt frühe Effektoren, die bereits vor und während der Penetrationsphase exprimiert werden, solche, deren Expression während der Etablierung der biotrophen Phase erfolgt und späte Effektoren [10]. In den verschiedenen Organen und Zelltypen werden darüber hinaus unterschiedliche Sets an Effektoren exprimiert, d. h. es gibt eine Anpassung an den physiologischen Zustand der jeweiligen Organe [11]. Ähnlich wichtig wurden vergleichende Genomanalysen von verwandten Brandpilzen, die größtenteils andere Wirts-

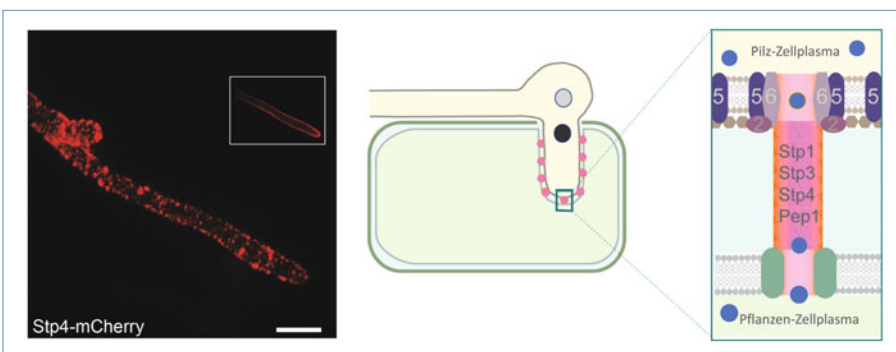
Hier steht eine Anzeige.

 Springer

- 1954 Rowell and DeVay: ***a*-Locus existiert in 2 Allelen, *a1* und *a2*, *b*-Locus ist multiallelisch**
- 1968 Puhalla: **Kompatibilitätsassays auf Festmedien**
- 1970 Puhalla: ***b*-Locus kommt in höchstens 25 Allelen in der Natur vor**
- 1971 Day and Anagnostakis: **Kreuzungsreaktion auf Medium mit Aktivkohlezusatz**
- 1988 Wang et al.: **Integratives Transformationssystem basierend auf Hygromycin als Selektionsmarker**
- 1988 Tsukada et al.: **Entwicklung autonom replizierender Plasmide mit hoher Transformationseffizienz**
- 1994 Snetselaar et al.: **Licht- und elektronenmikroskopische Analyse der *U. maydis*-Entwicklung in der Pflanze**
- 1989 Kronstad and Leong: **Klonierung des *b*-Locus**
- 1990 Schulz et al.: **Der *b*-Locus codiert für ein Homeodomänenprotein**
- 1992 Gillissen et al.: **Der *b*-Locus codiert für 2 Homeodomänenproteine, *bE* und *bW***
- 1992 Bölker et al.: **Der *a*-Locus codiert für ein Pheromon-Rezeptor-Erkennungssystem**
- 1996 Spellig et al.: **Etablierung von GFP als Vitalmarker für *U. maydis***
- 2004 Kämper: **Etablierung effizienter homologer Rekombination mit kurzen Flanken**
- 2006 Kämper et al.: **Konstruktion eines solopathogenen Stamms**
- 2006 Kämper et al.: **Annotierte Genomsequenz, Entdeckung der Effektorcluster**
- 2010 Schirawski et al.: **Vergleichende Genomanalyse als Werkzeug für die Entdeckung von Pathogenitätsdeterminanten**
- 2001 Brachmann et al.: **Etablierung regulierbarer Promotoren für die Expression von *bE* und *bW***
- 2016 Schuster et al.: **Adaptation der CRISPR-Cas9-Technologie für *U. maydis***
- 2018 Lanver et al.: **Zeitlich aufgelöste RNAseq-Analyse der biotrophen Entwicklung von *U. maydis***
- 2021 Ludwig et al.: **Entdeckung eines für Pathogenität essenziellen Proteinkomplexes auf der Zelloberfläche von *U. maydis***

rot: wichtige Entdeckungen, **grün:** wichtige methodische Fortschritte

▲ **Abb. 2:** Zeitstrahl für die Entwicklung von *Ustilago maydis* zu einem Modellsystem für biotrophe Pilze. Wichtige Entdeckungen mit Relevanz zum Verständnis der pathogenen Entwicklungen (rot) und wichtige technologische Fortschritte, die dies möglich machten (grün), wurden subjektiv von der Autorin ausgewählt. Einschlägige Literatur findet sich in [1, 2, 9, 17, 18].



▲ **Abb. 3:** Der Stp-Komplex und Modellvorstellungen zu seiner Funktion. Links ist eine Hyphe nach Infektion einer Maispflanze gezeigt, in der die Stp4-Komponente des Stp-Komplexes C-terminal mit mCherry fusioniert ist [16]. Fluoreszenz findet sich in „speckles“ auf der Oberfläche der Hyphe. Größenmarker 5 µm. Das Insert zeigt eine biotrophe Hyphe, die den apoplastischen mit mCherry fusionierten Effektor Pit2 [9] exprimiert, das Fusionsprotein umgibt die Hyphe gleichmäßig. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem Konfokalmikroskop aufgenommen. Im mittleren Teil der Abb. ist die Lage der „speckles“ schematisch dargestellt. Rechts findet sich ein schematisches, rein hypothetisches Modell zu der Struktur, in der der Stp-Komplex mittels EM nachgewiesen wurde. Über die beiden Transmembranproteine Stp5 und Stp6 ist der Komplex in der Plasmamembran des Pilzes verankert. Stp1, 2, 3, 4 und Pep1 sind weitere Komplexkomponenten. Der Komplex interagiert mit porenbildenden Proteinen (grün) der Maisplasmamembran, die die biotrophe Hyphe umgibt. Translozierte Effektoren sind als blaue Kugeln dargestellt.

pflanzen befallen, im Gegensatz zu *U. maydis* systemische Infektionen verursachen, keine Tumore induzieren und Sporen lediglich in Blüten bilden. Während das Effektorrepertoire von Brandpilzen zahlenmäßig vergleichbar ist [12], beobachtet man interes-

sante Abweichungen bezüglich ihrer Funktion. *Sporisorium reilianum*, der Maiskopfbrennpilz, verfügt über einen Tin2-ähnlichen Effektor, der jedoch kein Anthocyan induziert und nicht wie Tin2 von *U. maydis* eine Maiskinase stabilisiert, sondern zwei ortho-

loge Maiskinasen inhibiert. Dies und weitere Arbeiten erlaubten den Schluss, dass der *U. maydis*-Tin2-Effektor neofunktionalisiert wurde [13]. Spannend sind auch neuere Arbeiten zur Tumorentstehung, die auf den blattspezifisch exprimierten Effektor See1 zurückgehen. Für diesen wurde gezeigt, dass er die DNA-Synthese in ausdifferenzierten Blättern in den Bündelscheitelzellen reaktiviert. Die mit Tumorentstehung ebenfalls einhergehende Hypertrophie der benachbarten Mesophyllzellen ist in *see1*-Mutanten hingegen nicht betroffen. See1 wird bei der Tumorentstehung in den Antheren der männlichen Blüte nicht gebraucht, denn in diesen Zellen, die meristematisch aktiv sind, muss es lediglich zur Zellvergrößerung kommen [14]. Ein weiterer an der Tumorentstehung beteiligter Effektor ist Sts2, der aus einem Screen nach differenziell exprimierten Effektororthologen in *U. maydis* und *S. reilianum* hervorgegangen ist. Sts2 ist der erste *U. maydis*-Effektor, der nach Infektion im Zellkern der Pflanze nachgewiesen wurde und dort – im Komplex mit einem interagierenden Maistranskriptionsaktivator – die Expression von mehreren Regulatoren induziert, die vermutlich an der Tumorentstehung im Blatt beteiligt sind. Da weder die Überexpression von *U. maydis-sts1* noch die von *U. maydis-see1* in *S. reilianum* zur Tumorentstehung führten, sind vermutlich weitere Effektoren an diesem komplexen Differenzierungsvorgang beteiligt [15].

Obwohl viele Pilzeffektoren innerhalb von Wirtszellen wirken, ist derzeit unklar, wie sie für die Translokation ausgewählt werden und durch welche Mechanismen sie übertragen werden. Spezielle spritzenähnliche Systeme wie das Typ-III-System, das von pathogenen Bakterien für die Translokation von Effektoren in Wirtszellen verwendet wird, wurden bei Pilzen nicht nachgewiesen. Unter den neuartigen *U. maydis*-Effektoren wurden mittels Ko-Immunpräzipitation fünf entdeckt, die in einem stabilen Proteinkomplex mit zwei pilzlichen Transmembranproteinen vorliegen. Der Stp-Komplex ist Oberflächenexponiert und konnte durch Immunogold-EM in Strukturen nachgewiesen werden, die vom Pilz ausgehend in Wirtszellen hineinragen. Dort interagiert der Komplex mit porenbildenden Proteinen der pflanzlichen Plasmamembran (**Abb. 3**). In Einzelmutanten aller sieben Gene ist die Virulenz vollständig aufgehoben, die biotrophen Hyphen stoppen ihr Wachstum in der epidermalen Schicht, es erfolgt eine massive Induktion von Abwehr-

reaktionen und die Plasmamembran des Wirts, die normalerweise die biotrophen Hyphen umschließt, verliert ihre Integrität. Dies induziert Zelltod, und damit sind *stp*-Mutanten unfähig, eine biotrophe Interaktion zu etablieren. Neben ihrem Unvermögen, frühe Abwehrreaktionen der Pflanze zu unterdrücken, sind *stp*-Mutanten auch nicht in der Lage, Nicht-Wirts-Resistenz in Gerste zu induzieren, beides Reaktionen, die vermutlich auch von translozierten Effektoren abhängen [16]. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass der Stp-Komplex an der Translokation von Effektoren in die Wirtszelle beteiligt ist (Abb. 3). Ob der Komplex eine Pore ausbildet, über die die Barriere der pilzlichen Zellwand überwunden wird oder ob die Struktur aktiv an Effektortranslokation beteiligt ist, werden zukünftige Kryo-EM-Daten und funktionelle Tests zeigen müssen.

Damit hat sich *U. maydis* als großartiges System etabliert, die biotrophe Lebensweise eines eukaryotischen Pathogens in allen Facetten aufzuklären.

Danksagung

Stefanie Reissmann danke ich herzlich für ihre Hilfe bei den Abbildungen. ■

Literatur

- [1] Christensen JJ (1963) Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Am Phytopathol Soc, St. Paul, MN
- [2] Banuett F (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. Trends Genet 8: 174–180
- [3] Gillissen B, Bergemann J, Sandmann C et al. (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. Cell 68: 647–657
- [4] Kämper J, Reichmann M, Romeis T et al. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. Cell 81: 73–83
- [5] Kämper J, Kahmann R, Bölker M et al. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature 444: 97–101
- [6] Kämper J, Friedrich MW, Kahmann R (2020) Creating novel specificities in a fungal nonself recognition system by single step homologous recombination events. New Phytol 228: 1001–1010
- [7] Heimel K, Freitag J, Hampel M et al. (2013) Crosstalk between the unfolded protein response and pathways that regulate pathogenic development in *Ustilago maydis*. Plant Cell 25: 4262–4277
- [8] Lanver D, Tollot M, Schweizer G et al. (2017) *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. Nat Rev Microbiol 15: 409–421
- [9] Zuo W, Ökmen B, Depotter JRL et al. (2019) Molecular Interactions between smut fungi and their host plants. Annu Rev Phytopathol 57: 411–430
- [10] Lanver D, Müller AN, Happel P et al. (2018) The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNAseq analysis. Plant Cell 30: 300–323
- [11] Skibbe DS, Doehlemann G, Fernandes J et al. (2010) Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. Science 328: 89–92
- [12] Schuster M, Schweizer G, Kahmann R (2018) Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes. Fungal Genet Bio 112: 21–30
- [13] Tanaka S, Schweizer G, Rössel N et al. (2018) Neofunctionalization of the secreted Tin2 effector in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. Nat Microbiol 4: 251–257
- [14] Redkar A, Matei A, Doehlemann G (2017) Insights into host cell modulation and induction of new cells by the corn smut *Ustilago maydis*. Front Plant Sci 8: 899
- [15] Zuo W, Depotter JRL, Stolze SC et al. (2023) A transcriptional activator effector of *Ustilago maydis* regulates hyperplasia in maize during pathogen-induced tumor formation. Nat Commun 14: 6722
- [16] Ludwig N, Reissmann S, Schipper K et al. (2021) A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. Nat Microbiol 6: 722–730
- [17] Vollmeister E, Schipper K, Baumann S et al. (2012) Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. FEMS Microbiol Rev 36: 59–77
- [18] Heucken N, Tang K, Hüsemann L et al. (2023) Engineering and implementation of synthetic molecular tools in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis*. J Fungi 9: 480

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Regine Kahmann
 Max-Planck-Institut für terrestrische
 Mikrobiologie
 Karl-von-Frisch-Straße 10
 D-35041 Marburg
 kahmann@mpi-marburg.mpg.de

AUTORIN



Regine Kahmann

1967–1974 Biologiestudium und Promotion. 1974–1992 PostDoc und Junior-Gruppenleiterin, Wissenschaftliche Assistentin und Arbeitsgruppenleiterin. 1992–2000 C4-Professur für Genetik an der LMU in München. 2000–2019 Direktorin der Abteilung Organismische Interaktionen am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg. 2001–2019 W3-Professur für Genetik an der Universität Marburg. Seit 2019 em. Direktorin am MPI für terrestrische Mikrobiologie in Marburg.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer