

# Molekulare Aspekte der obligat biotrophen Parasit-Wirt-Interaktion am Beispiel der Rostpilze

MANUEL MÜLLER, MATTHIAS KOHLNDORFER, TOBIAS I. LINK & RALF T. VOEGELE

## Kurzfassung

Rostpilze stellen eine der bedeutendsten Gruppen von Pflanzenpathogenen dar. Verschiedene Vertreter dieser Ordnung verursachen jedes Jahr weltweit große Schäden an wichtigen Kulturpflanzen wie Weizen oder Soja. Wie die Echten und die Falschen Mehltäupilze sind Rostpilze obligat biotrophe Parasiten. Dies bedeutet, dass sie zur Vollendung ihres Lebenszyklus auf einen lebenden Wirt angewiesen sind. Eines der wesentlichen Merkmale dieser besonderen Lebensweise ist die Entwicklung von speziell differenzierten Hyphen, sogenannten Haustorien. Hierbei handelt es sich um hochspezialisierte Strukturen, welche in die Pflanzenzelle eingesenkt werden und dem Pilz die Aufnahme von Nährstoffen und die Unterdrückung pflanzlicher Abwehrmaßnahmen durch die Sekretion sogenannter Effektorproteine ermöglichen. Das Fachgebiet Phytopathologie am Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim beschäftigt sich unter anderem mit der Identifizierung und Charakterisierung der molekularen Vorgänge in diesen Haustorien. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den molekularen Aspekten der Nährstoffaufnahme und -verstoffwechslung, der Identifikation neuer Effektorproteine und der Entwicklung neuer Methoden zur Charakterisierung dieser Gruppe von Pathogenen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sollen nicht nur ein tieferes Verständnis der molekularen Aspekte der obligat biotrophen Parasit-Wirt-Interaktion ermöglichen, sondern längerfristig auch Verwendung in der Entwicklung neuer Ansätze für den Pflanzenschutz finden.

## Abstract

### Molecular aspects of obligate biotrophic parasite-host-interactions, the case of rust fungi

Rust fungi are one of the most important groups of plant pathogens, causing severe losses on major crops like wheat or soybean. Like the powdery and the downy mildews, rust fungi are obligate biotrophic parasites, depending on a living host to complete their life cycle. One of the defining features of biotrophy is the differentiation of highly specialized hyphae, so-called haustoria. Haustoria penetrate plant cells and form a narrow contact zone between host and parasite. The main functions of haustoria are the uptake of nutrients and the suppression of plant defense responses through secretion of so-called effector proteins. One of the research areas of Prof. RALF VOEGELE'S group at the University of Hohenheim is the identification and characterization of mole-

cular processes in haustoria of different rust fungi. The research at the Chair of Phytopathology is focused on molecular mechanisms playing crucial roles in nutrient uptake and metabolism, as well as on the identification of new effector proteins. Much emphasis is also placed on the development of new methods to characterize these pathogens. Results obtained from this work should enable a more profound understanding of obligate biotrophic pathogens and might also open new vistas in plant protection in the long run.

## Autoren

MANUEL MÜLLER, MATTHIAS KOHLNDORFER, DR. TOBIAS I. LINK & Prof. Dr. RALF T. VOEGELE  
 Fachgebiet Phytopathologie, Institut für Phytomedizin, Universität Hohenheim, Otto-Sander-Str. 5, 70599 Stuttgart, E-Mail: Ralf.Voegelé@uni-hohenheim.de

## 1 Einleitung

Pilze, welche der Ordnung Pucciniales (Basidiomycota, alte Bezeichnung: Uredinales) zugeordnet werden, werden im allgemeinen Sprachgebrauch als Rostpilze bezeichnet. Derzeit werden dieser Ordnung mehr als 7.000 Arten zugeschrieben, wovon 4.000 Arten aus der Gattung *Puccinia* (u.a. die meisten Getreide-Roste) und rund 600 Arten aus der Gattung *Uromyces* (u.a. viele Leguminosen-Roste) stammen. Rostpilze leben parasitisch auf höheren Pflanzen und verursachen zum Teil erhebliche Schäden in der Landwirtschaft. Wie auch die Erreger des Echten und Falschen Mehltaus (Erysiphales und Peronosporales), sind Rostpilze obligat biotrophe Parasiten. Anders als nekrotrophe Pilze wie *Fusarium* spp. oder *Septoria* spp., welche ihre Wirte schnell und gezielt abtöten und sich dann von abgestorbenem Gewebe ernähren, sind Rostpilze zur Reproduktion und zur Vollendung ihres Lebenszyklus zwingend auf lebendes Gewebe angewiesen. Diese Besonderheit setzt voraus, dass Rostpilze ihren Wirten während der Besiedlung nur begrenzt Schaden zufügen und zudem pflanzliche Abwehrreaktionen, wie den programmierten Zelltod, effektiv unterdrücken können.

Gleichzeitig müssen Rostpilze in der Lage sein, ausreichend Nährstoffe aus den Geweben des Wirts aufzunehmen. Als Antwort auf diese Herausforderungen haben Rostpilze besondere Strategien entwickelt.

Dazu gehört die Differenzierung von Haustorien. Dies sind hochspezialisierte Hyphen, welche bei Rostpilzen in den Mesophyllzellen des pflanzlichen Wirtes gebildet werden. Dabei wird nur die pflanzliche Zellwand durchbrochen, die pflanzliche Zellmembran wird dagegen eingestülpt und bildet zusammen mit der haustoriellen Membran und der extrahaustoriellen Matrix einen funktionellen Komplex (Tafel 1, Abb. 1).

Wie der Name Haustorium [haustum (lat.) = Schöpfkelle, haurire (lat.) = schöpfen, austrinken] zeigt, wurden diese Strukturen schon zu Zeiten ihrer Entdeckung vor rund 200 Jahren mit der Nahrungsaufnahme des Pilzes in Verbindung gebracht. Allerdings gehen die heute bekannten Funktionen dieser Strukturen weit über die bloße Aufnahme von Nährstoffen hinaus (siehe unten).

Mit diesem Artikel möchten wir einen Überblick über die molekularen Vorgänge der obligat biotropen Parasit-Wirt-Interaktion geben. Dabei sollen die molekularen Mechanismen der Nahrungsaufnahme sowie der Umgang des Parasiten mit pflanzlichen Abwehrsystemen im Vordergrund stehen. Um einen detaillierteren Einblick in das behandelte Thema zu bekommen, sei der interessierte Leser auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen.

## 2 Untersuchung der haustoriellen Genaktivität

Haustorien werden nur in lebenden Wirtszellen gebildet. Dieser Umstand macht eine Untersuchung der molekularen Vorgänge in diesen Strukturen prinzipiell sehr schwierig. Innerhalb der letzten Jahre wurden mehrere Verfahren für die Isolierung von Haustorien aus infiziertem Pflanzenmaterial entwickelt. In Hohenheim arbeitet man mit einer Affinitätschromatographischen Methode. Dabei nutzt man die Eigenschaft von bestimmten Proteinen (Lektinen), selektiv spezifische Oberflächenstrukturen (Oligosaccharide) der Haustorien zu binden. Diese Methode ermöglicht die effiziente Isolation von intakten Haustorien (Tafel 2, Abb. 2) und daran anschließend eine Untersuchung der molekularen Vorgänge in diesen Strukturen.

Um zu untersuchen, welche Gene in den Haustorien aktiv sind, werden sogenannte cDNA-Banken angelegt. Darunter versteht man eine molekulare Bibliothek aller zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribierten Gene einer Zelle. Jedes cDNA-Molekül dieser Bibliothek repräsentiert den spezifischen Bauplan eines in den Haustorien synthetisierten Proteins. Mittels molekularbiologischer Methoden können selektiv einzelne cDNA-Moleküle vervielfältigt und sequenziert werden. Über den Vergleich der gewonnenen Sequenzinformationen mit bereits bekannten Sequenzen anderer (Rost-) Pilze lassen sich anschließend Hinweise auf die Funktion und Struktur haustoriell exprimierter Proteine ermitteln.

Dabei konzentriert man sich in Hohenheim insbesondere auf die Arbeit mit dem Ackerbohnenrostpilz *Uromyces fabae*, welcher in der Rostforschung als Modellorganismus dient und auf die ökonomisch bedeutenden Schädlinge *Phakopsora pachyrhizi* (Erreger des Sojabohnenrostes) und *U. appendiculatus* (Erreger des Buschbohnenrostes).

## 3 Molekulare Aspekte der Nährstoffaufnahme

Obligat biotrophe Parasiten sind darauf angewiesen, Nährstoffe aus den Geweben ihrer Wirte zu akquirieren. Die Aufnahme von Aminosäuren und Zuckern aus den infizierten Wirtszellen erfolgt dabei über spezielle Transporter. Die Entdeckung eines ausschließlich in der Haustorienmembran (vgl. Abb. 1) lokalisierten Hexosetransporters in *U. fabae* stellte den Beweis dar, dass bei Rostpilzen die Aufnahme von Zuckern vollständig auf das Haustorium beschränkt ist. Durch die Aktivität dieses Transporters werden die Hexosen D-Glukose und D-Fruktose in das Innere des Haustoriums transportiert und dort von anderen Enzymen verstoffwechselt. Da in Pflanzenzellen nur sehr wenig freie Hexosen verfügbar sind, muss dafür zunächst das in der Pflanze vorhandene Disaccharid Saccharose enzymatisch gespalten werden. Für diese Aufgabe konnte neben einer Invertase auch eine  $\beta$ -Glukosidase identifiziert werden. Durch die Aktivität dieser Enzyme kommt es zudem zu einer Umprogrammierung des infizierten Gewebes, welche die ständige Verlagerung von Nährstoffen aus gesunden Teilen der Pflanze zur Folge hat. Neben den Mechanismen der Nährstoffaufnahme konnten auch die daran anschließenden Stoffwechselwege entschlüs-

selt werden. Die Identifikation einer haustoriell exprimierten Glukokinase spricht dafür, dass die aufgenommene Glukose bereits in den Haustorien verstoffwechselt wird. Der weitere Weg der aufgenommenen Fruktose konnte über die Entdeckung zweier Alkoholdehydrogenasen erklärt werden. Diese Enzyme wandeln die aufgenommene Fruktose in die Zuckeralkohole Mannitol bzw. einen Teil der aufgenommenen Glukose in D-Arabinol um. Zuckeralkohole dienen dem Pilz vermutlich in erster Linie als Energiespeicher und werden in beträchtlichen Mengen in die neu gebildeten Sporen eingelagert. Kommt es zum Auskeimen der Sporen, können diese Verbindungen über einfache enzymatische Reaktionen wieder in Zucker umgewandelt werden. Damit steht dem Pilz während der Besiedelung des Wirtes ausreichend Energie zur Verfügung.

#### 4 Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr

Obligat biotrophe Parasiten wie die Rostpilze sind, wie anfangs bereits erwähnt, auf die Interaktion mit einem lebenden Wirt angewiesen. Diese besondere Lebensweise setzt voraus, dass Rostpilze in der Lage sind, pflanzliche Abwehrreaktionen zu unterdrücken oder abzumildern. Auch hier wurden bereits einige Mechanismen entschlüsselt, welche eng mit der Nährstoffaufnahme des Pilzes verknüpft sind. Ein wesentlicher Bestandteil pflanzlicher Abwehrreaktionen ist die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid. Eine Möglichkeit, diese Substanzen für den Pilz unschädlich zu machen, besteht in der Freisetzung großer Mengen von Zuckeralkoholen wie Mannitol und D-Arabinol, welche aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften in der Lage sind, diese Verbindungen abzufangen. Tatsächlich konnte in befallenen Gewebe die Freisetzung großer Mengen dieser Verbindungen aus dem pilzlichen Myzel nachgewiesen werden. Auch die Funktion der bereits erwähnten  $\beta$ -Glukosidase scheint nicht nur der Bereitstellung von Hexosen zu dienen. Vergleichende Analysen dieses Enzyms zeigten große Ähnlichkeiten zu anderen bereits beschriebenen Enzymen dieser Klasse, welche an der Entgiftung pflanzlicher Sekundärmetabolite beteiligt sind.

Eine weitere wichtige Rolle spielt die Sekretion sogenannter Effektorproteine. Diese Proteine können beispielsweise an der Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr beteiligt sein und sind daher

ein wichtiger Faktor für die Virulenz des Pathogens. Für die Rostforschung von besonderem Interesse sind dabei Proteine, welche in das pflanzliche Gewebe sekretiert und von der infizierten Pflanzenzelle aufgenommen werden. Rust Transferred Protein 1 (RTP1p) stellt den ersten Vertreter dieser Klasse von Proteinen dar, mittlerweile konnten aber bereits weitere Kandidaten identifiziert und lokalisiert werden (Tafel 2, Abb. 3).

Aus Arbeiten mit anderen phytopathogenen Organismen weiß man, dass diese als Effektorproteine, oder kurz, als Effektoren bezeichneten Proteine wichtige Aufgaben übernehmen. Die Wirkung von Effektoren reicht dabei von der Beeinflussung der pflanzlichen Genexpression oder des pflanzlichen Metabolismus bis hin zur Unterdrückung pflanzlicher Abwehrmechanismen. Aufgrund der vielfältigen Funktionen und der damit verbundenen Beeinflussung der Parasit-Wirt-Interaktion, stellt die Identifikation von Effektoren derzeit einen Schwerpunkt nicht nur in der Rostforschung dar.

#### 5 Fazit und Ausblick

Die Aufklärung der molekularen Aspekte obligat biotropher Parasit-Wirt-Interaktionen ist für das Verständnis dieser besonderen Lebensweise von grundlegender Bedeutung. Im Zentrum dieser besonderen Form des Parasitismus stehen dabei die (molekularen) Vorgänge in den Haustorien. Für die Rostpilze konnten bereits wichtige Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Nährstoffaufnahme und der Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen erlangt werden. Die Verwendung moderner Sequenzierverfahren soll die zukünftige Identifikation von Effektorkandidaten erleichtern und beschleunigen. Wichtige Fragestellungen sind die an der Aufnahme von Effektoren in die Pflanzenzelle beteiligten Mechanismen sowie die Identifizierung pflanzlicher Interaktionspartner. Mit der Beantwortung dieser Fragen könnten sich neue Perspektiven für den Pflanzenschutz ergeben. Neben der Identifikation resistenter Pflanzensorten ist beispielsweise die gezielte Stilllegung pilzlicher Effektoren durch biotechnologisch veränderte Pflanzen denkbar.

#### Dank

Wir bedanken uns für die Möglichkeit, unsere Forschung an der Universität Hohenheim in dieser Arbeit vorstellen zu können. Unser besonderer Dank gilt Prof.

Dr. K. MENDGEN für die jahrelange gute Zusammenarbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der Projekte.

### Ausgewählte Publikationen

- KEMEN, E., KEMEN, A. C., RAFIQI, M., HEMPEL, U., MENDGEN, K., HAHN, M. & VOEGELE R. T. (2005): Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. – *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 1130-1139.
- LINK, T. I. & VOEGELE, R. T. (2008): Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. – *Molecular Plant Pathology*, **9**: 59-66.
- VOEGELE, R. T., HAHN, M., LOHAUS, G., LINK, T., HEISER, I. & MENDGEN, K. (2005): Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*. – *Plant Physiology*, **137**: 190-198.
- VOEGELE, R. T., HAHN, M. & MENDGEN, K. (2009): The Uredinales: Cytology, Biochemistry, and Molecular Biology. – In: DEISING, H. B. (ed.): *The Mycota V*: 69-98; Berlin (Springer).
- VOEGELE R. T., STRUCK C., HAHN M. & MENDGEN K. (2001) The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 8133-8138.
- VOEGELE, R. T., WIRSEL, S., MÖLL, U., LECHNER, M. & MENDGEN, K. (2006): Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. – *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**: 625-634.

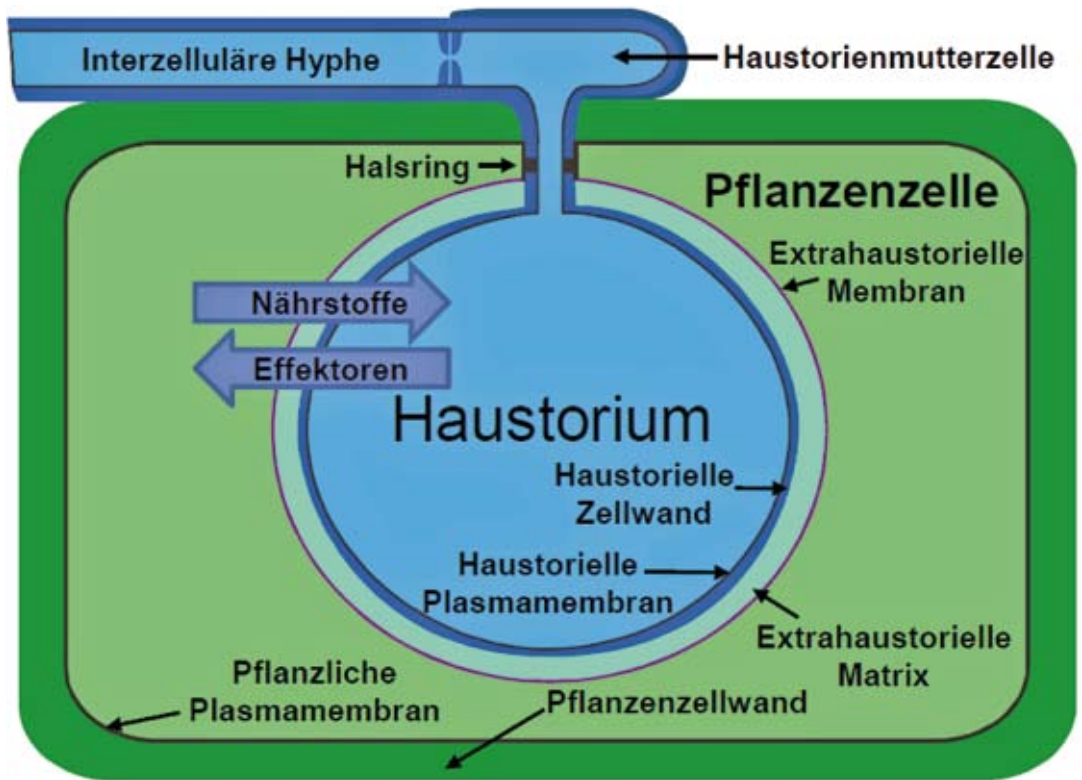


Abbildung 1. Schematische Darstellung eines Haustoriums des Ackerbohnenrostes *Uromyces fabae*.

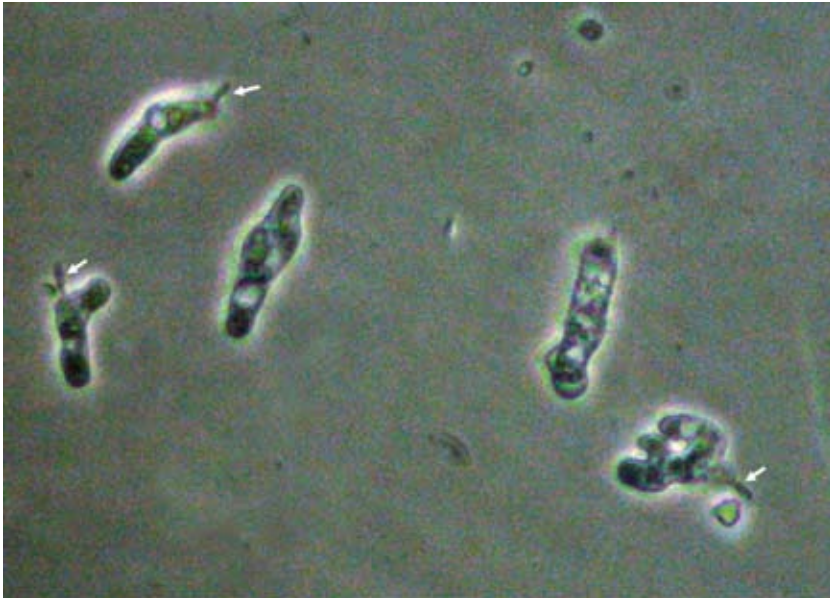


Abbildung 2. Lichtmikroskopische Aufnahme isolierter Haustorien von *Uromyces fabae* mit teilweise deutlich sichtbarem Hals (Pfeile, vgl. Abb. 1). – Foto: M. MÜLLER.

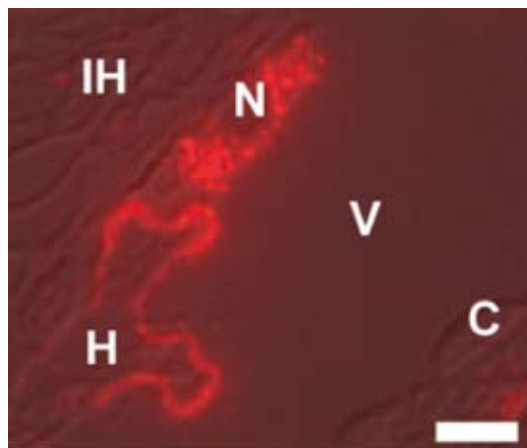


Abbildung 3. Immunzytologische Detektion des Effektors *Uf*-Hsp25p in der Peripherie eines Haustoriums (H) und gleichzeitig im Zellkern (N) der Wirtszelle. Das Protein konnte dagegen nicht in anderen pilzlichen Strukturen (IH), dem Zytoplasma (C) oder der Vakuole (V) der Wirtszelle nachgewiesen werden (Balken: 5  $\mu$ m). – Foto: T. LINK.